

UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO

**ANÁLISE CROMOSSÔMICA DOS LINFÓCITOS DO SANGUE PERIFÉRICO E
DOS POLIMORFISMOS DO GENE DE REPARO DO DNA *XRCC1* EM
INDIVÍDUOS COM ANEMIA FALCIFORME**

Polyanna Miranda Alves

UBERABA-MG

2007

Polyanna Miranda Alves

**ANÁLISE CROMOSSÔMICA DOS LINFÓCITOS DO SANGUE PERIFÉRICO E
DOS POLIMORFISMOS DO GENE DE REPARO DO DNA *XRCC1* EM
INDIVÍDUOS COM ANEMIA FALCIFORME**

Tese apresentada ao Curso de Pós-graduação em Patologia, área de concentração “Patologia Clínica”, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito parcial para obtenção do *Título de Mestre*.

Orientadora: Profa. Dra. Lusânia Maria Gregg Antunes

Co-Orientador: Prof. Dr. Paulo Juliano Roberto Martins

Uberaba-MG

Fevereiro, 2007

A48a

Alves, Polyanna Miranda Alves.

Análise cromossômica dos linfócitos do sangue periférico e dos polimorfismos do gene de reparo do DNA *XRCC1* em indivíduos com anemia falciforme / Polyanna Miranda Alves. -- 2007.
f. : tab. ; fig.

Tese (Mestrado) em Ciências - Patologia Clínica –
Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2007.
Orientador: Profª. Drª. Lusânia Maria Gregg Antunes.

1. Aberração cromossômica. 2. Anemia falciforme. 3.
Cisplatina. 4. *XRCC1*. I. Título. II. Antunes, Lusânia Maria
Gregg.

NLM – QS677

Dedicatória

Àquele que é todo amor e justiça, a causa primária de todas as coisas.

Minha dedicatória à Deus ...

Que permitiu a oportunidade de continuar meus estudos, oferecendo força, coragem e bom ânimo nos momentos de fraqueza, e que colocou no meu caminho pessoas fundamentais na concretização dos meus ideais.

Àquela que se fez presente em todos os momentos, possibilitando que este trabalho se desenvolvesse com amor, dedicação e cientificismo.

Minha dedicatória à Prof. Dra. Lusânia Maria Gregg Antunes ...

Por ter sido a guia quando eu estava perdida,

Por ter sido a luz clareando o caminho,

Por ser severa quando eu era displicente,

Por ter ensinado e não simplesmente mostrado como fazer,

Por ter compartilhado comigo os seus aprendizados e conhecimentos.

Agradeço especialmente

Meus pais ...

Luzia Miranda Alves e *Venancio Alves*, independente dos meus erros ou acertos sempre estiveram ao meu lado oferecendo apoio e acreditando na minha capacidade até mesmo quando eu duvidava. Sou imensamente grata pelo amor que vocês me proporcionam em nosso lar, que foi a base fundamental para meu equilíbrio emocional no desenvolvimento deste projeto.

Minha sobrinha ...

Cecília Alves Correa, que mesmo com pouca idade, com um simples sorriso, conseguia aliviar as minhas preocupações.

Minha irmã ...

Tatiana Miranda Alves Correa, pela alegria da convivência, incentivo, apoio e principalmente pela confiança.

Minha “quase” co-orientadora ...

Profa Dra Francisca da Luz Dias, Professora Visitante da Disciplina de Genética da UFTM, pela amizade, ensinamentos, ética, dignidade e, principalmente, humanismo.

Agradecimentos

Ao Prof Dr Paulo Juliano Roberto Martins, Professor da Disciplina de Hematologia da UFTM, pela co-orientação da dissertação e auxílio na seleção dos pacientes.

À Profa Dra Renata Canalle, Professora Adjunto da Disciplina de Genética da Universidade Federal da Bahia, pela supervisão do desenvolvimento das técnicas de Biologia Molecular no Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Puericultura e Pediatria da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo – FMRP/USP. Agradeço também pela disposição e paciência, fatores diferenciais, com os quais transmitiu seus conhecimentos.

À Profa Dra Marly Aparecida Spadotto Balarin, Professora Adjunto da Disciplina de Genética da UFTM, por ter permitido a utilização do espaço do laboratório da disciplina de Genética durante a realização deste trabalho.

Aos Professores Dr. André Luiz Pedrosa, Dra. Carmen Lúcia Bassi e Dra. Elaine Cristina Laurentino, pelo incentivo e ensinamentos transmitidos.

Aos amigos e funcionários da Disciplina de Genética, Elaine de Jesus Pessoa, Heloísa Marcelina Cunha Palhares, Roseane Lopes da Silva Grecco, Ricardo Manoel da Cruz e Vera Lúcia de Azevedo, pelos ensinamentos e alegrias compartilhados.

Ao Hemocentro Regional de Uberaba pelo acesso aos pacientes com Anemia Falciforme e principalmente aos funcionários que colaboraram no desenvolvimento deste trabalho realizando as coletas de sangue.

À Universidade de Uberaba, UNIUBE, que possibilitou a adequação dos horários de trabalho para a participação em disciplinas, congressos e realização de experimentos. Sou grata também, pois, através desta instituição conheci professores que fazem parte da minha trajetória acadêmica e profissional.

À Associação dos Falcêmicos de Uberaba pela atenção, incentivo e auxílio na seleção dos pacientes.

Aos indivíduos voluntários participantes do projeto, pela doação da amostra sangüínea, compreensão e incentivo.

Aos funcionários da biblioteca, especialmente à *Cileida de Fátima Costa, Eliane Resende e Elisabete Perez Caramori Ambrósio* pela paciência e dedicação.

À *Profa. Dra. Roseli Aparecida da Silva Gomes*, coordenadora e as secretárias *Denise Teresinha Cardoso* e *Nelma Aparecida Ferreira Salgado* do Curso de Pós-graduação em Patologia da UFTM, pela gentileza e dedicação com os pós-graduandos e docentes credenciados.

Aos professores componentes da banca examinadora que gentilmente aceitaram o convite para avaliarem esta dissertação de Mestrado.

Aos biomédicos e estagiários *Aline Aparecida Ferreira, Ana Paula Gonçalves de Oliveira, Cristiane Pontes Andrade, Lízia Maria Franco dos Reis e Campos, Rafaela de Barros e Lima Bueno e Mateus Gandra Campos*, pela amizade, incentivo e momentos de convivência.

Aos pós-graduandos *Cláudio Fidalgo, Estela de Oliveira, Mara Ribeiro de Almeida, Pâmela Aveiro Resende*, pela amizade, colaboração, conselhos e momentos compartilhados na alegria e na tristeza.

Aos amigos e companheiros de trabalho do Laboratório de Histopatologia da Universidade de Uberaba, *Ana Carolina Penha Coimbra, Eduardo Fonseca Vicente, Guilherme Peracini Kock, Lucimar de Paiva Gonçalves, Marcelo Sivieri de Araújo, Regiane Guissone Dutra*, pela solidariedade, apoio e incentivo.

Aos meus amigos *Andréa Cristina da Costa, Carlos Eduardo D'Angelis, Marieles da Silveira, Rubiana Faria Ripposati* por estarem presentes no meu caminho, fazendo com que este fosse mais tranquilo e prazeroso nos momentos de dificuldades.

Muito obrigada !!!

Apoio Financeiro

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Genética, do Departamento de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (Uberaba-MG) e com o apoio das seguintes Entidades e Instituições:

- Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM);
- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

Sumário

Lista de figuras

Lista de tabelas

Lista de abreviaturas e símbolos

1. Introdução	01
1.1. Anemia falciforme	01
1.2. Aberrações cromossômicas	05
1.3. Polimorfismos genéticos	09
2. Objetivos	16
3. Material e métodos	17
3.1. Casuística	17
3.2. Análise citogenética	18
3.2.1. Análise de aberrações cromossômicas	18
3.2.2. Ensaio de sensibilidade com o antitumoral cisplatina	20
3.3. Análise dos polimorfismos	21
3.3.1. Extração e amplificação do DNA	21
3.3.2. Determinação dos genótipos	23
3.4. Análise estatística	25
4. Resultados	27
4.1. Aberrações cromossômicas e sensibilidade ao antitumoral cisplatina	27
4.2. Análise dos polimorfismos genéticos	33
4.3. Influência dos polimorfismos sobre as aberrações cromossômicas	37
5. Discussão	41
5.1. Aberrações cromossômicas e sensibilidade ao antitumoral cisplatina	41
5.2. Polimorfismos genéticos e influência sobre as aberrações cromossômicas	47

6. Conclusões	54
7. Resumo	56
8. Abstract	58
9. Referências bibliográficas	59
10. Anexos	

Lista de figuras

- Figura 1:** Protocolo de tratamento das culturas 21
- Figura 2:** Gel de agarose convencional 2% para checagem de amplificação por PCR Multiplex do gene *XRCC1*, onde M = marcador de peso molecular (200 pb).
Linhas 1-13 amostras amplificadas 24
- Figura 3:** PCR-RFLP para detecção do polimorfismo *XRCC1-MspI*, onde **M**= marcador de peso molecular (100 pb). **Linha 1** heterozigoto para o códon 194 e homozigoto selvagem para o códon 399. **Linhas 2, 4, 10, 12 e 13** homozigotos selvagens para ambos os códons. **Linhas 3, 5-8 e 11** homozigotos selvagens para o códon 194 e heterozigotos para o códon 399; **Linha 9** homozigoto selvagem para o códon 194 homozigoto polimórfico para o códon 399 24
- Figura 4:** Valores médios de índice mitótico, expressos em porcentagem, calculados em linfócitos do sangue periférico de indivíduos totais da amostra ($n=30$), não falcêmicos ($n=15$) e falcêmicos ($n=15$). Índice mitótico nas culturas sem tratamento (A) e (B) nas culturas tratadas *in vitro* com o antitumoral cisplatina (0,5 µg/mL) 28
- Figura 5:** Distribuição do número de quebras/célula encontrado na análise de linfócitos do sangue periférico de indivíduos totais da amostra ($n=30$) e dos indivíduos não falcêmicos ($n=15$) ou com anemia falciforme ($n=15$), sem qualquer tratamento (A) e tratados *in vitro* com o antitumoral cisplatina (0,5 µg/mL) (B) 32
- Figura 6:** Sensibilidade dos linfócitos humanos ao tratamento com o antitumoral cisplatina (0,5 µg/mL) *in vitro*, indicada pela média de quebras/célula em indivíduos não falcêmicos (A) ou com anemia falciforme (B) 40

Lista de tabelas

- Tabela 1:** Associações de SNPs (*Single nucleotide polymorphisms*) e o seu impacto em diferentes aspectos nos pacientes com anemia falciforme 11
- Tabela 2:** Características dos indivíduos não falcêmicos e falcêmicos dos quais foram analisados os linfócitos do sangue periférico e os genótipos do gene de reparo *XRCCI* 18
- Tabela 3:** Pares de “primers” para as reações de PCR e condições de reação utilizadas para detecção por RFLP, enzimas de restrição, tamanho dos produtos de PCR e dos fragmentos de restrição observados para cada alelo dos polimorfismos estudados 25
- Tabela 4:** Distribuição dos diferentes tipos de aberrações cromossômicas e metáfases alteradas, expressos em 100 células, em linfócitos do sangue periférico de indivíduos não falcêmicos e falcêmicos 29
- Tabela 5:** Distribuição dos diferentes tipos de aberrações cromossômicas e metáfases alteradas, expressos em 100 células, em linfócitos do sangue periférico de indivíduos não falcêmicos e falcêmicos tratados *in vitro* com o antitumoral cisplatina (0,5 µg/mL) 29
- Tabela 6:** Número médio de quebras/células em linfócitos do sangue periférico de indivíduos não falcêmicos e falcêmicos, sem qualquer tratamento ou tratados *in vitro* com o antitumoral cisplatina (0,5 µg/mL) 31
- Tabela 7:** Identificação dos polimorfismos do gene de reparo do DNA *XRCCI* em indivíduos não falcêmicos 34
- Tabela 8:** Identificação dos polimorfismos do gene de reparo do DNA *XRCCI* em indivíduos falcêmicos 35
- Tabela 9:** Distribuição das frequências genotípicas e alélicas dos polimorfismos do gene *XRCCI* em indivíduos falcêmicos e não falcêmicos 36
- Tabela 10:** Polimorfismos do códon 194 do gene de reparo *XRCCI*, média das aberrações cromossômicas (AC) e média das metáfases alteradas (MA) observadas em linfócitos do sangue periférico de indivíduos não falcêmicos e falcêmicos38
- Tabela 11:** Polimorfismos do códon 194 do gene de reparo *XRCCI*, média das aberrações cromossômicas (AC) e média das metáfases alteradas (MA) induzidas pelo tratamento com o antitumoral cisplatina em linfócitos do sangue periférico de indivíduos não falcêmicos e falcêmicos 38
- Tabela 12:** Polimorfismos do códon 399 do gene de reparo *XRCCI*, média das aberrações cromossômicas (AC) e média das metáfases alteradas (MA) observadas em linfócitos do sangue periférico de indivíduos não falcêmicos e falcêmicos39

Tabela 13: Polimorfismos do códon 399 do gene de reparo <i>XRCCI</i> , média das aberrações cromossômicas (AC) e média das metáfases alteradas (MA) induzidas pelo tratamento com o antitumoral cisplatina em linfócitos do sangue periférico de indivíduos não falcêmicos e falcêmicos	39
--	----

Lista de abreviaturas e símbolos

%	Porcentagem
>	Maior
<	Menor
µg	Micrograma
µL	Microlitro
AC	Aberrações Cromossômicas
AF	Indivíduos com anemia falciforme
<i>Arg</i>	Arginina
APE1	<i>Apurinic endonuclease 1</i>
BER	<i>Base excision repair</i>
bp	Pares de Base
C	Indivíduos controle sem anemia falciforme
cDDP	Cisplatina
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CCR2	Receptor químico
CCR5	Receptor químico
Chb	Quebras cromossômicas
Ctb	Quebras cromatídicas
Ctg	“gap” cromatídico
Chg	“gap” cromossômico
CYP2E1	Citocromo P450 oxidase
DSB	<i>Double-strand break repair</i>
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeo Trifostato

DP	Desvio Padrão
EDTA	Ácido Etilenodietanolamina-tetra-acético
ET1	Endotélio 1
g	Gravidade
<i>Gln</i>	Glutamina
GSTM1	Glutathione-S-transferase
GSTP1	Glutathione-S-transferase
h	Horas
H ₂ O	Água
HbC	Hemoglobina C
HbE	Hemoglobina E
HbS	Hemoglobina S
<i>His</i>	Histidina
IC	Intervalo de Confiança
IM	Índice Mitótico
ISCN	<i>International System for Human Cytogenetic Nomenclature</i>
KCl	Cloreto de potássio
MA	Metáfases alteradas
<i>Met</i>	Metionina
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
mL	Mililitros
MN	Micronúcleo
<i>MPO</i>	Mieloperoxidase
<i>MspI</i>	<i>Moraxella species I</i>
MTHR	Metilenotetraidrofolato redutase
n	Número da amostra

NER	<i>Nucleotide excision repair</i>
NOS3	Óxido nítrico sintase
°C	Grau Celsius
p	Nível de probabilidade
PARP	<i>Poly(ADP-ribose)polymerase</i>
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PNK	<i>Polynucleotide kinase</i>
RR	Rearranjo
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphisms</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphisms</i>
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borato-EDTA
TE	Tris-EDTA
<i>Thr</i>	Triptofano
UI	Unidade Internacional
UGT	UDP-glucuronosiltransferase
USP	Universidade de São Paulo
<i>XRCC1</i>	<i>X-Ray Cross-Complementing group-1</i>
<i>XRCC3</i>	<i>X-Ray Cross-Complementing group-3</i>

Introdução

1. Introdução

1.1. Anemia falciforme

A herança do intenso processo de miscigenação sofrido no Brasil se refletiu nos aspectos culturais, sociais e genéticos. Dentre as várias características herdadas, estão as modificações ou mutações genéticas que podem resultar em doenças humanas, tais como as hemoglobinopatias. As hemoglobinopatias resultam de anormalidades nas moléculas de hemoglobina, constituindo uma das principais e mais freqüentes doenças genéticas que acometem os seres humanos (DI NUZZO; FONSECA, 2004; SILVA FILHO et al., 2005).

As alterações na molécula da hemoglobina acometem milhões de indivíduos em todo o mundo. As talassemias, herdadas dos europeus e dos asiáticos, e a anemia falciforme vinda com os africanos, estão entre as doenças hereditárias mais prevalentes no Brasil. Estima-se que 10% da população mundial seja portadora dos genes da hemoglobina S e de talassemias (SILVA FILHO et al., 2005). No Brasil, as hemoglobinopatias constituem um problema de saúde pública e as estimativas indicam que mais de 8.000 indivíduos são afetados com a forma homozigota, e 700 a 1000 casos novos de doença falciforme ocorrem por ano no país (ZAGO, 2001).

A anemia falciforme é uma doença de caráter genético, descrita pela primeira vez em 1910 por Herrick, ocorre com maior freqüência, mas não exclusiva, em indivíduos de descendência africana. É originada por uma mutação no cromossomo 11 que resulta na substituição de um ácido glutâmico pela valina na posição seis da extremidade N-terminal na cadeia β da globina, dando origem à hemoglobina S (“Sickle”) ao invés da hemoglobina A (“Adult”) (DI NUZZO; FONSECA, 2004). A mudança conformacional que HbS apresenta quando desoxigenada expõem o aminoácido valina na superfície molecular da cadeia β -globina, ao invés do ácido glutâmico polar. Isto permite interações hidrofóbicas intermolecular, e também a polimerização da HbS (MADIGAN; MALIK, 2006).

Indivíduos com anemia falciforme são caracterizados pela homozigose do gene mutante para hemoglobina S (HbSS). O estado heterozigoto (HbAS), comumente referido como traço falcêmico ou traço falciforme é usualmente assintomático, mas pouco se sabe sobre esta condição (ADORNO et al., 2005). Nos indivíduos com traço falcêmico, na maioria dos casos, não são encontradas manifestações clínicas ou alterações laboratoriais, mas a morbidade depende de fatores ambientais, sendo que a literatura relata desde pequenos problemas de saúde até manifestações clínicas mais graves, como a morte destes indivíduos (FABRON, 1986). A co-herança de outra mutação no gene para β -globina (HbC e HbE) causa uma doença falciforme relativamente benigna, podendo levar a uma discreta anemia hemolítica e esplenomegalia (MADIGAN; MALIK, 2006).

A anemia falciforme é uma doença das células vermelhas do sangue, sendo uma desordem caracterizada pela alteração conformacional e hemólise destas células sangüíneas (BUCHANAN et al., 2004). As hemácias que contêm as hemoglobinas HbS polimerizadas tornam-se rígidas e sem plasticidade. A rigidez dessas células contribui para o processo de oclusão microvascular que leva à isquemia do tecido e disfunção dos órgãos (DE FRANCESCHI; CORROCHER, 2004; HIRAN, 2005). Outros tipos celulares, tais como as plaquetas, os neutrófilos polimorfonucleares e as células endoteliais vasculares também participam da patofisiologia desta doença (KLINGS; FARBER, 2001).

As manifestações clínicas dos indivíduos com anemia falciforme incluem episódios de dores, síndrome torácica aguda, hipertensão pulmonar crônica, acidente vascular cerebral, colelitíase, insuficiência renal e retinopatia (MEHTA et al., 2006; STEINBERG, 2005). Infecções, tais como, pneumonia, osteomielite, meningite e urinárias constituem as causas mais comuns de hospitalização destes pacientes (COSTA, 2005).

Entretanto, pesquisas têm demonstrado que a patofisiologia da anemia falciforme é muito complexa. Inflamação, ativação endotelial, anormalidades na membrana das

hemácias e a disponibilidade anormal de vários fatores vasoativos parecem ter um importante papel em desencadear a vaso-oclusão e os vários eventos clínicos.

Contudo, a grande variabilidade clínica e as características hematológicas da anemia falciforme continuam a oferecer um desafio para a completa compreensão dos seus mecanismos patofisiológicos e para a identificação do alvo para as intervenções terapêuticas. Aparentemente, a variabilidade da doença poderia ser influenciada por fatores não-genéticos, tais como a deficiência de ácido fólico, os traumas e ulcerações na pele e o estresse oxidativo (WEATHERALL et al., 2005; MADIGAN; MALIK, 2006).

Os indivíduos com anemia falciforme estão sujeitos ao aumento do estresse oxidativo, especialmente durante as crises vaso-oclusivas e de síndrome torácica aguda (HEBBEL et al., 1982). Acredita-se que alguns dos aspectos das anormalidades encontradas na anemia falciforme estejam relacionados ao estresse oxidativo das hemácias e das células endoteliais. Estudos têm demonstrado que a HbS tem uma tendência inerente à auto-oxidação, apresentando uma exacerbada geração de radicais livres de oxigênio (SHENG; SHARIFF; HEBBEL, 1998). Este estresse oxidativo representa o desequilíbrio entre a geração de espécies reativas de oxigênio e o baixo conteúdo de antioxidantes celulares nas hemácias.

Uma outra causa para o aumento do estresse oxidativo nos indivíduos com anemia falciforme, é a alta concentração de ferro ou de compostos contendo ferro no plasma dos pacientes durante os episódios de hemólise e transfusões sanguíneas (AMER et al., 2006). É conhecido que o ferro catalisa a formação de espécies reativas de oxigênio e o estado crônico de estresse oxidativo nas hemácias, leucócitos polimorfonucleares e plaquetas tornam estas células susceptíveis aos danos endógenos induzidos pelas espécies reativas de oxigênio nas membranas, proteínas e DNA (HEBBEL et al., 1982; AMER et al., 2006). A indução de lesões no DNA, tais como as quebras de fita dupla e aumento na frequência de

micronúcleos foram descritos em indivíduos com alfa ou beta-talassemia, cujo estresse oxidativo exacerbado foi mediado pela presença de altas concentrações plasmáticas de ferro (OFFER et al. 2005).

Há escassez de dados na literatura sobre a frequência de aberrações cromossômicas em indivíduos com hemoglobinopatias, principalmente pacientes com anemia falciforme. Em relação a anemia falciforme, apenas um estudo foi encontrado em levantamento bibliográfico, datado de 1962, logo após o desenvolvimento das técnicas citogenéticas para a análise de cromossomos humanos, que descreveu a avaliação de 100 metáfases obtidas de um único indivíduo com número diplóide normal de 46 cromossomos (BOTTURA; FERRARI, 1962).

Khayat et al. (2004), analisando a mutagenicidade do agente antineoplásico hidroxiuréia em linfócitos de pacientes com anemia falciforme, observaram curiosamente, pois este não era o objetivo da investigação, que os linfócitos de três indivíduos falcêmicos não tratados com o antineoplásico apresentaram duas ou três aberrações cromossômicas estruturais em 100 metáfases analisadas. Entretanto, estes resultados não foram explorados e não foram comparados com a frequência de danos cromossômicos em indivíduos não falcêmicos. O mesmo estudo também mostrou que os indivíduos com anemia falciforme poderiam apresentar uma possível instabilidade cromossômica, com uma maior susceptibilidade aos agentes genotóxicos, quando comparados com indivíduos sadios não-falcêmicos (KHAYAT et al., 2006). Desta forma, seria interessante a realização de estudos que comparassem as frequências de danos cromossômicos entre indivíduos falcêmicos e não falcêmicos, por meio da análise de aberrações cromossômicas em linfócitos humanos em cultura, como um biomarcador das lesões induzidas no DNA.

1.2. Aberrações cromossômicas

A caracterização citogenética e a classificação das aberrações cromossômicas têm desempenhado um papel essencial na compreensão dos mecanismos genéticos e na sua aplicação na genética clínica. A definição de cariótipos normais e das aberrações cromossômicas de maior ocorrência tem permitido o esclarecimento do funcionamento da maquinaria genética, dos padrões de evolução cariotípica e revelado os danos cromossômicos relacionados com as doenças humanas, contribuindo como uma importante ferramenta no prognóstico e diagnóstico clínico (HENG et al., 2006).

Os biomarcadores citogenéticos são os mais frequentemente usados em estudos da população humana. Sua sensibilidade para avaliar a exposição aos agentes genotóxicos e seu papel de prever o risco de câncer tem contribuído para este sucesso (BONASSI et al., 2005). Após uma extensiva avaliação da literatura científica, o uso desses biomarcadores recebeu recentemente forte validação com as pesquisas em milhares de indivíduos estudados e por meio de comparações em investigações de casos-controles, os quais confirmaram o papel das alterações cromossômicas como marcador do risco de câncer (HAGMAR et al., 1998; BONASSI et al., 2000, 2004). Muitos cânceres estão associados a tipos específicos de aberrações cromossômicas. Contudo, as curvas dose-resposta para as aberrações cromossômicas são diferentes, dependendo do estágio do ciclo celular em que a célula foi exposta e dos tipos de aberrações cromossômicas encontradas (OBE et al., 2002).

As aberrações cromossômicas são partes visíveis microscopicamente de largo espectro de mudanças no DNA (OBE et al., 2002). As aberrações cromossômicas estruturais incluem todos os tipos de quebras e alterações do cromossomo e são usualmente dividida em quebras ou “gaps” do tipo cromossômico ou do tipo cromatídico (ALBERTINI et al., 2000). As aberrações do tipo cromossômicas são geralmente induzidas por agentes S-independentes na primeira metáfase, após a exposição das células

danificadas na fase G₁ do ciclo celular. Células danificadas em S/G₂ levam às quebras cromatídicas (ALBERTINI et al., 2000; NORPPA et al., 2006). De acordo com a classificação proposta por Savage (1997), as aberrações cromossômicas são distribuídas nos seguintes tipos:

- ✦ Quebras do tipo cromatídicas – a lesão ocorre em apenas um determinado local de uma das cromátides do cromossomo;
- ✦ Quebras do tipo cromossômicas – ocorrem em um determinado local de ambas as cromátides irmãs de um mesmo cromossomo;
- ✦ Rearranjo complexo – quando ocorre troca de partes de cromossomos homólogos ou não, em virtude da ocorrência de quebras seguida de interação das partes lesionadas (exemplo: anel, trirradial e quadrirradial);
- ✦ “Gaps” – correspondem às lesões acromáticas, com pequenas mudanças estruturais, sendo estas lesões em geral, menores do que a largura da cromátide.

A presença de aberrações cromossômicas e de micronúcleos é reconhecida como uma conseqüência da instabilidade genômica. Em células não tumorais, tais como os linfócitos do sangue periférico de indivíduos, os danos cromossômicos podem ser usados como biomarcadores da deficiência de micronutrientes, dos efeitos genotóxicos decorrentes da exposição ocupacional e ambiental ou como conseqüência da transformação neoplásica (BACIUCHKA-PALMARO et al., 2002). Assumindo que os mecanismos de formação de dano cromossômico são similares em diferentes tecidos, é esperado que o nível de dano em linfócitos possa refletir os riscos e o nível de lesão em tecidos com tendência ao desenvolvimento de câncer (ALBERTINI et al., 2000; BONASSI et al., 2005; SKJELBRED, et al., 2006).

Não apenas nos processos neoplásicos, mas recentemente, pacientes com outras doenças têm sido avaliados em estudos que buscam encontrar uma possível correlação da doença com o aumento na frequência de alterações citogenéticas em linfócitos do sangue periférico. Foi descrita uma associação positiva entre a aterosclerose e níveis aumentados de trocas entre cromátides irmãs nos linfócitos destes pacientes, confirmando que esta categoria é mais susceptível a instabilidade genômica (PERNICE et al., 2006). Diferenças significativas na indução de lesões no DNA, pelo teste do Cometa, foram encontradas em pacientes com diabetes, quando comparados com os indivíduos sadios controles (SARDAS et al., 2001). Wyatt et al. (2006) observaram um aumento na geração de espécies reativas de oxigênio e dos danos oxidativos em linfócitos de pacientes com diabetes mellitus, contribuindo para aumentar a susceptibilidade dos pacientes à indução de danos cromossômicos.

Na tentativa de aperfeiçoar ainda mais a capacidade de avaliar os danos cromossômicos e sua associação com os riscos de desenvolvimento de câncer e de outras doenças na população humana, técnicas citogenéticas convencionais e moleculares estão sendo aplicadas como ferramentas que permitam a avaliação da susceptibilidade individual. A resposta individual ao estresse químico ou físico pode variar de acordo com a função de um gene em particular, ou de uma combinação entre os genes que regulam a absorção, metabolismo, morte celular (apoptose/necrose), sistema imune e reparo do DNA (BONASSI et al., 2005). As enzimas de reparo do DNA estão associadas com a susceptibilidade a reconhecidos agentes clastogênicos, isto é, que quebram os cromossomos, tais como os antitumorais doxorrubicina, cisplatina e radiações ionizantes (ANTUNES; TAKAHASHI, 1999; ANTUNES et al., 2005; 2007; DIAS et al., 2006; NADIN et. al., 2006).

Dados da análise citogenética têm mostrado variações quantitativas na susceptibilidade dos danos cromossômicos induzidos por agentes mutagênicos (SPITZ et al., 1989; CANTERO et al., 2006; HERNÁNDEZ et al., 2006). É importante a consideração de métodos que determinem a susceptibilidade genética e que possam prever os riscos de desenvolvimento de doenças complexas resultantes de exposição ambiental e ocupacional (BONASSI et al., 2005).

Os biomarcadores citogenéticos, tais com as aberrações cromossômicas, trocas entre cromátides irmãs e micronúcleos, têm a desvantagem da limitação do tempo de detecção. A descontinuidade da exposição leva a diminuição ou até mesmo ao desaparecimento dos danos ao longo dos anos. Contudo, tem sido demonstrado em vários estudos que a exposição aos agentes genotóxicos ou carcinogênicos, por meio do ambiente ou endógeno, pode provocar um aumento na susceptibilidade celular, o qual poderá ser detectado por ensaios de sensibilidade (“cytogenetic challenge assays”) durante ou vários anos após a exposição do indivíduo aos agentes genotóxicos (LIOU et al., 2002).

A exposição do indivíduo que apresenta esta susceptibilidade resulta em uma resposta alterada na análise citogenética de seus linfócitos do sangue periférico cultivados *in vitro*, quando estes são subsequentemente submetidos ao ensaio de sensibilidade aos agentes genotóxicos (HSU et al., 1996). Hsu e seus colaboradores foram precursores no desenvolvimento dos ensaios de sensibilidade aos agentes genotóxicos, empregando como indutor de danos cromossômicos o agente antitumoral bleomicina (HSU et al., 1989; 1991).

Neste teste de Hsu, os indivíduos são classificados em hipersensíveis, sensíveis ou não sensíveis em resposta ao tratamento dos linfócitos com a bleomicina, sendo avaliada a relação número de quebras/número de células analisadas. Este ensaio foi proposto como uma avaliação indireta da capacidade de reparo individual, com o objetivo de identificar

subpopulações consideradas de alto risco e tem sido muito utilizado como uma ferramenta de detecção de susceptibilidade ao câncer. Atualmente, o teste de sensibilidade genotóxica foi expandido com a utilização de outros agentes genotóxicos, além da bleomicina, tais como o óxido de nitroquinolina e benzo[*a*]pireno (GU et al., 1999), a mitomicina C (LIOU et al., 2002; DUYDU et al., 2006), raios X e ultravioleta (AU; SALAMA; SIERRA-TORRES, 2003) e o antitumoral cisplatina (ABUL-HASSAN et al., 2004).

Uma vez que os testes citogenéticos que avaliam a sensibilidade de indução de danos, após a exposição aos agentes genotóxicos, são métodos indiretos da medida de eficiência do sistema de reparo do indivíduo, uma abordagem alternativa e mais completa levaria em consideração as interações entre o genótipo/fenótipo, com a realização sistemática de estudos reportando a associação entre biomarcadores citogenéticos e análise dos genótipos dos genes de reparo do DNA (BONASSI et al., 2005).

1.3. Polimorfismos genéticos

Tem sido reconhecida a existência de variações significativas na população humana em resposta aos agentes mutagênicos e para o desenvolvimento em longo prazo de problemas de saúde. Embora muitos fatores possam contribuir, a compreensão das bases genéticas destas variações é de grande interesse porque o conhecimento pode levar à melhores predições dos problemas da saúde humana e prevenções efetivas das doenças (AU; NAVASUMRIT; RUCHIRAWAT, 2004). A variação funcional do produto dos genes polimórficos é a provável responsável pelas diferenças individuais, após a exposição a agentes genotóxicos do ambiente ou endógenos. Ainda que estes polimorfismos representem uma pequena variação entre os indivíduos, eles constituem um grande fator de impacto sobre os riscos de desenvolvimento de câncer e outras doenças entre as diferentes populações (AHSAN; RUNDLE, 2003).

Os polimorfismos genéticos geralmente são encontrados em genes com baixa expressão fenotípica, com capacidade para modular a interação entre os fatores exógenos ou endógenos com alvos celulares específicos. Os alelos mais comuns determinam apenas pequenas alterações na atividade das enzimas, portanto o risco de desenvolvimento de tumores é pequeno. Mas, quando estes polimorfismos são encontrados com certa frequência, podem ser responsáveis por uma parcela significativa dos casos de câncer (ZIJNO et al., 2006).

Os polimorfismos estão presentes em pelo menos 1% da população geral (BOER, 2002). O tipo de variação mais comumente encontrado na sequência de DNA são os polimorfismos de único nucleotídeo (SNPs – “single nucleotide polymorphism”). A determinação de polimorfismos de único nucleotídeo tem se tornado um importante método de caracterização de diferenças individuais no mapeamento genético, quando comparado à sequência padrão genômica. As estratégias para obter o genótipo dos genes que apresentam polimorfismos de único nucleotídeo têm seu foco nas regiões que codificam possíveis alterações nos aminoácidos, no processo de divisão entre íntrons e éxons ou nas regiões promotoras dos genes (BONASSI et al., 2005).

De várias estimativas, a frequência de polimorfismos de único nucleotídeo em seres humanos pode estar em torno de 1 em cada 1000 nucleotídeos, representando de 50.000 a 100.000 o número destes polimorfismos no genoma humano (AU, 2006). Entretanto, estes polimorfismos são considerados raros e o único modo de incluí-los como biomarcadores de susceptibilidade são os estudos de monitorização em grandes populações humanas (BONASSI et al., 2005). Considerando-se a compreensão limitada e a relação complexa entre genótipo-fenótipo, foi proposto que as variações genotípicas deveriam ser investigadas nas doenças genéticas (AHSAN; RUNDLE, 2003).

Pela conclusão do Projeto Genoma Humano, um grande número de polimorfismos de único nucleotídeo tem sido identificado, que podem potencialmente afetar diferentes aspectos na fisiopatologia de várias doenças, incluindo a doença falciforme (KUTLAR, 2005). A associação entre os polimorfismos e variabilidade clínica pode ser útil para investigações futuras sobre os riscos potenciais nos indivíduos portadores de anemia falciforme (STEINBERG, 2005). Vários polimorfismos gênicos foram recentemente identificados em indivíduos falcêmicos (Tabela 1).

Tabela 1. Associações de SNPs (*Single nucleotide polymorphisms*) e o seu impacto em diferentes aspectos nos pacientes com anemia falciforme

Gene	Códon	Consequência Clínica	Referência
<i>ETI</i>	T8002C	Aumento do risco da síndrome torácica aguda	Chaar et al., (2006)
<i>MPO</i>	G463A	Maior susceptibilidade a infecções	Costa et al., (2005)
<i>UGT</i>	UGT1A1	Fator de risco para colelitíase	Chaar et al., (2005)
<i>NOS3</i>	-786C	Tendência para o desenvolvimento de graves manifestações clínicas	Vargas et al., (2005)
<i>CCR2</i>	CCR2-64I		
<i>CCR5</i>	CCR5delta32		
<i>MTHR</i>	C677T	Aumento do risco de doença vascular	Couto et al., (2004)

ETI = endotélio 1, *MPO* = mieloperoxidase, *UGT* = UDP-glucuronosiltransferase, *NOS3* = óxido nítrico sintase, *CCR2* = receptor químico, *CCR5* = receptor químico, *MTHR* = metilenotetraidrofolato redutase

O polimorfismo C677T no gene da *MTHR* (metilenotetraidrofolato redutase) associado ao aumento dos níveis séricos de homocisteína total foi descrito como um fator de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (COUTO et al., 2004). O polimorfismo G463A no gene da *MPO* (mieloperoxidase) parece ter um papel importante na susceptibilidade de infecção nos indivíduos falcêmicos (COSTA et al., 2005). O polimorfismo T8002C no gene *ET-1* (endotélio 1) foi investigado em crianças falcêmicas

associado ao aumento do risco para a manifestação da síndrome torácica aguda (CHAAR et al., 2006). Não há relatos na literatura sobre a determinação dos polimorfismos do gene *XRCC1* (“*X-Ray Cross-Complementing Group 1*”) em indivíduos com anemia falciforme, muito estudado em associação com o câncer e outras doenças, pela sua relevância no reparo de quebra de fita simples do DNA.

A molécula de DNA é continuamente sujeita a vários estresses, que resultam tanto dos processos metabólicos celulares internos, quanto da exposição aos agentes genotóxicos e clastogênicos do ambiente. Um sistema de reparo eficiente é necessário para a manutenção da integridade do genoma (WILDING et al., 2005). As investigações têm revelado que os indivíduos que apresentam o sistema de reparo comprometido apresentam maiores taxas de mutações e de instabilidade genômica (CORNETTA et al., 2006).

Na maioria das células, o dano no DNA não reparado pode resultar em apoptose ou levar a um crescimento celular descontrolado e subsequentemente o câncer. Se o dano é reconhecido pelo maquinário celular, várias respostas podem ocorrer para prevenir a duplicação na presença dos erros genéticos. A alteração pode ser reparada em nível de DNA capacitando a célula para duplicação como planejado (GOODE; ULRICH; POTTER, 2002). O DNA é reparado por diferentes vias dependendo da natureza do dano. Mais de 150 genes que codificam proteínas relacionadas aos diferentes mecanismos de reparo do DNA foram identificados, com aproximadamente 400 polimorfismos de único nucleotídeo caracterizados em 80 genes analisados (WILDING et al., 2005).

Os genes de reparo do DNA podem ser classificados em grupos associados com a sinalização ou a regulação do reparo de DNA e, por outro lado, em grupos de genes associados com mecanismos de reparo distintos, tais como, o reparo *mismatch* (MMR – *mismatch repair*), reparo por excisão de base (BER – *base excision repair*), reparo por excisão de nucleotídeo (NER – *nucleotide excision repair*) e reparo de quebras de fita

dupla do DNA (DSB – *double-strand break repair*). As mutações em genes envolvidos no reparo do DNA são responsáveis pelo desenvolvimento de tumores e por várias doenças hereditárias caracterizadas por alterações metabólicas complexas (CHRISTMANN, et al., 2003).

O reparo de quebras de fita simples, induzidas por uma variedade de fatores externos e internos, incluindo as radiações ionizantes, os agentes alquilantes e as espécies reativas de oxigênio, acontece por meio do processo de reparo de excisão de bases, que depende da função da proteína de reparo do DNA XRCC1, devido a sua capacidade para interagir com as enzimas DNA polimerase beta, DNA ligase III, APE1 (*apurinic endonuclease 1*), PNK (*polynucleotide kinase*) e poli ADP-ribose polimerase [PARP – *poly(ADP-ribose)polymerase*]. Não foi descrita qualquer atividade enzimática para a proteína XRCC1, entretanto ela interage com componentes enzimáticos de cada estágio do reparo de quebra da fita simples do DNA (CALDECOTT, 2003).

Embora pertencentes à mesma família, os genes *XRCC* são integrantes de diferentes mecanismos de reparo do DNA e suas proteínas não têm similaridade nas funções bioquímicas (CORNETTA et al., 2006). O gene *XRCC1* está localizado no cromossomo 19q13.2. Muitas variantes deste gene têm sido descritas (MATEUCA et al., 2005). Mais de sessenta polimorfismos de único nucleotídeo no gene *XRCC1* estão listados na base de dados Ensembl (HUNG et al., 2005), mas os mais extensivamente estudados são Arg194Trp (C26304T) no éxon 6, Arg280His (G27466A) no éxon 9 e Arg399Gln (G28152T) no éxon 10 (SHEN et al., 1998). O número de quebras de fita simples de DNA foi aumentado em indivíduos homozigotos para o polimorfismo do códon 399 éxon 10 do gene *XRCC1* em um estudo realizado com a população da Europa Central (VODICKA et al., 2004). Assim, os fatores de risco ambientais, do mesmo modo que etnia, sexo, estilo de vida e fatores de risco genéticos como outros polimorfismos, combinados com as variantes

do *XRCC1* podem aumentar a susceptibilidade aos danos cromossômicos (QU; MORIMOTO, 2005).

Na literatura há poucos artigos que reportam a associação entre a análise de polimorfismos genéticos e os biomarcadores citogenéticos, tais como os micronúcleos e a análise de aberrações cromossômicas. Um dos objetivos do estudo colaborativo do “European Study Group on Cytogenetics Biomarkers and Health” foi esclarecer como os polimorfismos genéticos de genes do metabolismo de xenobióticos e da integridade do DNA, como os genes de reparo, influenciam a frequência basal ou modulam os níveis dos biomarcadores citogenéticos nos linfócitos periféricos dos indivíduos. A maioria destes polimorfismos pode interferir com a produção dos danos cromossômicos (NORPPA et al., 2006).

Apesar das limitações referentes ao tamanho das populações investigadas e dos resultados contraditórios, alguns estudos mostraram a presença da interação entre as frequências de aberrações cromossômicas e um número restrito de polimorfismos genéticos, envolvendo os genes de ativação metabólica *GSTM1*, *GSTP1*, *CYP2E1*, ou genes de reparo do DNA *XRCC1* e *XRCC3* (AU; SALAMA; SIERRA-TORRES, 2003). Em relação ao gene de reparo do DNA *XRCC1*, a presença de pelo menos um alelo variante (*Gln* ao invés de *Arg* no gene) e *Met* ao invés de *Thr* no gene *XRCC3* está associada com o aumento nas frequências de aberrações cromossômicas ou micronúcleos (MATEUCA et al., 2005; BONASSI et al., 2005). Em um estudo envolvendo 651 indivíduos caucasianos noruegueses, os portadores do alelo *XRCC1* 280His apresentaram um aumento significativo de aberrações cromossômicas, independente da idade e de hábito tabagista (SKJELBRED et al., 2006).

Portanto, é importante investigar a possível influência do polimorfismo do gene de reparo *XRCC1* associado aos biomarcadores citogenéticos nos linfócitos do sangue

periférico. Selecionamos o gene de reparo *XRCC1* pela sua relevância no reparo de quebra de fita simples do DNA e por não haver relatos na literatura sobre a determinação dos polimorfismos do gene *XRCC1* em indivíduos com anemia falciforme.

Objetivos

2. Objetivos

Os objetivos específicos deste trabalho foram:

- ✦ Comparar as frequências de aberrações cromossômicas e metáfases alteradas nos linfócitos do sangue periférico de indivíduos não falcêmicos e falcêmicos;
- ✦ Verificar a presença de alterações na sensibilidade genotóxica quando os linfócitos dos indivíduos com anemia falciforme e de indivíduos não falcêmicos são tratados *in vitro* com o antitumoral cisplatina;
- ✦ Identificar os polimorfismos do gene de reparo do DNA *XRCC1* nos indivíduos falcêmicos e não falcêmicos;
- ✦ Avaliar se os polimorfismos do gene de reparo do DNA *XRCC1*, códons 194 e 399, têm alguma influência na indução dos danos cromossômicos nestes grupos amostrais.

Material e métodos

3. Material e métodos

3.1. Casuística

Participaram da pesquisa quinze indivíduos falcêmicos, diagnosticados pelo Hemocentro Regional de Uberaba (quatro homens e onze mulheres) e quinze indivíduos não falcêmicos (quatro homens e onze mulheres), todos voluntários que doaram uma amostra de 10 mL de sangue por punção venosa. Os indivíduos dos dois grupos, falcêmicos e não falcêmicos foram pareados por sexo, etnia e idade na faixa etária de 18 a 35 anos (Tabela 2). Os critérios de exclusão para os indivíduos portadores de anemia falciforme foram: ter recebido transfusão de sangue nos últimos três meses, usar medicamentos quelantes e ser tabagista. Os critérios de exclusão para os indivíduos não falcêmicos foram o tabagismo, presença de infecções recentes, uso de medicação crônica nos últimos quatro meses e exposição às radiações nos últimos seis meses.

Foi realizado um contato pessoal com cada doador (voluntários sadios e pacientes), no qual foram fornecidas todas as informações sobre os objetivos da pesquisa e o formulário para a assinatura do consentimento pós-informação para posterior coleta do material. Os projetos *Análise cromossômica dos linfócitos do sangue periférico de indivíduos com anemia falciforme* e *Análise do polimorfismo do gene de reparo do DNA XRCC1 em indivíduos com anemia falciforme*, desenvolvidos nesta dissertação, foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (Protocolo nº 539, aprovado em 2004 e Protocolo nº 630, aprovado em 2005, respectivamente).

Tabela 2. Características dos indivíduos não falcêmicos e falcêmicos dos quais foram analisados os linfócitos do sangue periférico e os genótipos do gene de reparo *XRCC1*

	Não falcêmicos	Falcêmicos
Nº indivíduos	15	15
Idade (anos)		
Média ± D.P.	25,6 ± 4,51	25,6 ± 5,24
Faixa etária	19 – 34	18 – 35
Gênero		
Mulheres (%)	11 (73,3)	11 (73,3)
Homens (%)	4 (26,7)	4 (26,7)
Etnia		
Branços (%)	6 (40,0)	6 (40,0)
Pardos (%)	3 (20,0)	3 (20,0)
Negros (%)	6 (40,0)	6 (40,0)

D.P. = Desvio padrão

3.2. *Análise Citogenética*

3.2.1. *Análise de aberrações cromossômicas*

As preparações citológicas para a obtenção das metáfases em linfócitos do sangue periférico humano se basearam na técnica de Moorhead et al. (1960), seguindo o protocolo revisado por Albertini et al. (2000). Estes procedimentos são detalhados a seguir:

- Colhem-se 5 mL de sangue periférico de cada indivíduo por punção venosa, utilizando-se agulhas e seringas descartáveis contendo heparina sódica (Hipolabor, 5000UI/mL).

- Adicionar 15 gotas do sangue em frascos de cultura contendo um volume de 5 mL de meio de cultura completo, composto por 80% de meio RPMI 1640 (Gibco-Invitrogen), 20% de soro bovino fetal (Gibco-Invitrogen), 2% de fitohemaglutinina (PHA, Gibco-Invitrogen) em relação ao volume total.
- As culturas foram mantidas em estufa a 37°C por 72 horas.
- Adiciona-se 25 µl de colchicina (Sigma-Aldrich, Co. USA) a cada frasco de cultura na concentração final de 0,4 µg/mL – 50 minutos antes da colheita.
- Após o tempo de cultivo, procede-se à colheita, agitando-se os frascos para desprender as células; transfere-se o material dos frascos para os tubos de centrífuga. Centrifuga-se o material a 1200g por 9 minutos.
- Despreza-se o sobrenadante e ressuspende-se as células delicadamente em 5 ml de solução hipotônica (KCl 0,075M) à 37° por 25 minutos.
- Adiciona-se aproximadamente 0,5 mL de fixador recém-preparado (metanol-ácido acético na proporção 3:1) (Merck), ressuspende-se as células. Centrifugar o material por 9 minutos a 1200g.
- Despreza-se o sobrenadante, adiciona-se 5 mL de fixador e ressuspende-se as células. Centrifugar o material por 9 minutos a 1200g.
- Repetir o passo anterior duas vezes. Na última centrifugação deixa-se material suficiente para a confecção das lâminas.
- Usando-se lâminas bem limpas e mantidas em água destilada gelada, goteja-se o material fixado, de duas a quatro gotas, inclinando-se as lâminas para espalhar melhor o material.
- A coloração convencional das lâminas para análise de aberração cromossômica foi realizada com solução de Giemsa/Tampão (Na_2HPO_4 e KH_2PO_4 a 0,06M e pH 6,8) (Merck) na proporção 1:30, por um período de 5 minutos.

A análise citogenética foi realizada em microscópio de luz, com objetiva de 100 vezes para avaliar as aberrações cromossômicas presentes e o índice mitótico. Foram analisadas somente as metáfases com 46 ± 1 cromossomos.

O índice mitótico (2000 células/indivíduo), o número de metáfases com aberrações cromossômicas e o total de aberrações cromossômicas (200 metáfases/indivíduo) dos indivíduos falcêmicos e não falcêmicos foram analisados em lâminas codificadas, para evitar tendenciosidades na identificação dos danos cromossômicos. Os diferentes tipos de aberrações cromossômicas foram classificados de acordo com o ISCN (1985).

3.2.2. Ensaio de sensibilidade com o antitumoral cisplatina

Hsu et al. (1989; 1991) recomendaram o teste de sensibilidade genotóxica com o tratamento de linfócitos humanos em cultura com um reconhecido agente antitumoral indutor de danos cromossômicos. Este marcador citogenético poderia aumentar a precisão dos ensaios epidemiológicos, com a identificação de indivíduos ou populações sensíveis que apresentariam taxas maiores de quebras/célula. Nos experimentos, para o ensaio de sensibilidade com o antitumoral cisplatina, as culturas foram preparadas como descrito anteriormente, sendo que 24 horas após o início das culturas, as células receberam tratamento com 25 µl de cisplatina, na concentração final de 0,5 µl/mL, conforme protocolo apresentado na Figura 1. A cisplatina (*cis*-diamminechloroplatinum II) CAS No. 15663-27-1 foi gentilmente cedida pela Quiral Química do Brasil S.A. A concentração deste agente antitumoral foi determinada com base em estudos da literatura (ANTUNES et al., 2005).

As lâminas foram analisadas em microscópio de luz, com objetiva de 100 vezes para avaliar as aberrações cromossômicas presentes e o índice mitótico. O índice mitótico (2000 células/indivíduo), o número de metáfases com aberrações cromossômicas e o total

de aberrações cromossômicas (100 metáfases/indivíduo) dos indivíduos falcêmicos e não falcêmicos foram analisados em lâminas codificadas, para evitar tendenciosidades na identificação dos danos cromossômicos. Os diferentes tipos de aberrações cromossômicas foram classificados de acordo com o ISCN (1985).



Figura1. Protocolo de tratamento das culturas.

3.3. *Análise dos polimorfismos*

3.3.1. *Extração e amplificação do DNA*

As amostras de sangue foram obtidas por punção venosa a vácuo utilizando tubos com EDTA. A extração do DNA foi realizada a partir da camada leucocitária, obtida por centrifugação de sangue total, utilizando a técnica de fenol/clorofórmio (JIN et al., 1997). Após a extração, as amostras de DNA foram armazenadas em 150 µl de água MilliQ estéril e mantidas à -4°C até o uso. Para o estudo de polimorfismo, os fragmentos foram co-amplificados no termociclador PTC-100 (MJ *Research, Inc*) e submetidos à eletroforese (100 V) em cuba contendo tampão TBE 1X (Gibco-BRL, Life Technologies, Rockville, MD), para a verificação de amplificação do gene *XRCC1*.

As reações foram visualizadas em gel de agarose (Gibco-BRL) 2,0% feito com tampão TBE 1,0X e corado com 10 µl de brometo de etídio (na concentração de 10 mg/mL). Para cada 5 µl de amostra foram adicionados 3 µl de azul de bromofenol 0,25% para a visualização da corrida.

Para comparar o peso das bandas foi usado marcador de peso molecular de 100 pares de base (pb) diluído (216 µl de TE 1X, 40 µl de tampão de amostra, 24 µl de marcador de peso molecular), sendo colocado na primeira canaleta do gel. Foi usado também um branco (todos os reagentes exceto o DNA), com o intuito de assegurar que não houve contaminação das amostras, o qual foi aplicado na última canaleta. Os géis foram observados e fotografados com filme preto e branco (Asa-100) em transluminador de luz ultravioleta.

A reação de amplificação em cadeia por PCR e o polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição (RFLP) *MspI* no gene *XRCC1* foram obtidos de acordo com o método de Lunn et al. (1999) modificado, conforme descrito a seguir:

Para um volume total de 22,5 µl por reação foi utilizado:

- 13,3 µl de H₂O MilliQ estéril,
- 2,5 µl de tampão (20 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, pH 8,4).
- 1,5 µl (3 mM) de MgCl₂,
- 0,5 µl (200 mM) de dNTPs (Gibco-BRL/200 mM)
- 1,0 µl (100 ng/µl) de cada “primer”: *194F* e *194R* (Gibco-BRL),
- 1,5 µl (100 ng/µl) de cada “primer”: *399F* e *399R* (Gibco-BRL),
- 0,2 µl (1U) de Taq DNA polimerase (Gibco-BRL),
- 2,0 µl (150 ng/µl) de DNA genômico ,
- o ciclo de co-amplificação foi: 94°C por 4 minutos (“melting”), 30 ciclos de 94°C por 30 segundos (“melting”), 65°C por 90 segundos (“annealing”) e 72°C por 1 minuto, seguidos de 5 minutos a 72°C e 30 minutos a 4°C (“extension”).
- os “primers” utilizados foram:

194F: 5'-GCCCCGTCCCAGGTA-3'

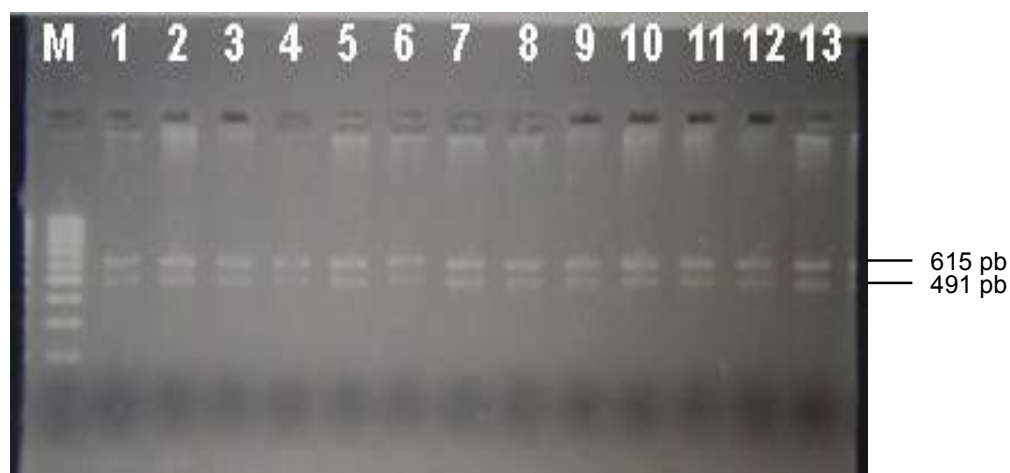
194R: 5'-AGCCCCAAGACCCTTTCACT-3'

399F: 5'-TTGTGCTTTCTCTGTGTCCA-3'

399R: 5'-TCCTCCAGCCTTTTCTGATA-3'

3.3.2. Determinação dos genótipos

Após a reação de amplificação, 20 µl do produto de PCR foram digeridos com 15U (0,75 µl) da enzima *MspI* (New England BioLabs, Beverly, MA), 1,75 µl de H₂O e 2,5 µl 615 pb, referente ao genótipo polimórfico (*Gln/Gln*), o qual não sofre ação da enzima de tampão 2, a 37°C por uma noite, e então analisado em gel de poliacrilamida 10% submetido à eletroforese a 150 V. Para o polimorfismo do códon 194, a presença das bandas de 292 pb representa o genótipo selvagem (*Arg/Arg*), enquanto as bandas de 313 pb caracterizam o genótipo homozigoto polimórfico (*Trp/Trp*), indicando a ausência do sítio de restrição da enzima *MspI*. O genótipo heterozigoto (*Arg/Trp*) apresenta as duas bandas: 313 e 292pb. A ampliação do segmento de 174 pb serve como o controle da reação. Quanto ao polimorfismo no códon 399, a amplificação gera um fragmento constante de *MspI*, originando uma banda não clivada. O genótipo selvagem (*Arg/Arg*) possui um sítio para a enzima *MspI*, a qual cliva o produto da amplificação, gerando uma banda de 374 e outra de 221 pb, o genótipo homozigoto (*Gln/Gln*) apresenta uma banda de 615 pb e o genótipo heterozigoto (*Arg/Gln*) apresenta as três bandas. As figuras 2 e 3 exemplificam a amplificação e o padrão obtido após a digestão, respectivamente.



As frequências do genótipo *XRCCI* polimórfico e do genótipo normal foram calculadas para a amostra de 15 indivíduos falcêmicos e 15 indivíduos não falcêmicos. Os pacientes e os controles foram separados em classes, de acordo com o grupo étnico a que pertenciam (brancos, negros ou pardos) e sexo (masculino ou feminino) (Tabela 2). Na Tabela 3 estão relacionadas as condições finais de reação para detecção dos polimorfismos analisados, incluindo os pares de “primers” para as reações de PCR, as condições de reação, enzimas de restrição e o tamanho dos produtos de PCR e dos fragmentos de restrição observados para cada alelo dos polimorfismos.

Tabela 3. Pares de “primers” para as reações de PCR e condições de reação utilizadas para detecção por RFLP, enzimas de restrição, tamanho dos produtos de PCR e dos fragmentos de restrição observados para cada alelo dos polimorfismos estudados

<i>Gene</i>	<i>Primers</i>	<i>Tamanho do produto da PCR (pb)</i>	<i>Condições da PCR Programa.MgCl₂</i>	<i>Enzima de restrição</i>	<i>Tamanho dos fragmentos de DNA (pb)</i>
<i>XRCCI</i>	Códon 194: F5'-GCCCGTCCCAGGTA3' R5'AGCCCCAAGACCTTTCACT-3'	491	94°C-4'; 30 ciclos: 94°C-30'', 68°C-90'', 72°C-1'; 72°C-5'-3mM	<i>Msp</i> I	174, 292, 313, 491
	Códon 399: F5'-TTGTGCTTCTCTGTGTCCA-3' R5'TCCTCCAGCCTTTTCTGATA-3'	615			221, 374, 615

3.4. Análise estatística

Os resultados das análises citogenéticas foram avaliados por meio do programa de computador GraphPad InStat versão 3.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). O KS-teste (Kolmogorov-Smirnov) foi aplicado para comprovar a distribuição normal dos dados. Os resultados entre não falcêmicos e falcêmicos foram comparados pelo Teste de Mann-Whitney, com nível de significância de $p < 0,05$. O grupo de indivíduos totais não fez parte da avaliação estatística. Na análise estatística dos genótipos e aberrações

cromossômicas, os indivíduos heterozigotos e homozigotos polimórficos variantes foram somados, devido ao pequeno número amostral dos homozigotos variantes. O teste de probabilidade exato de Fisher (AGRESTI, 1992) foi aplicado para verificar a significância estatística das associações genotípicas quando comparados os polimorfismos entre os falcêmicos e não falcêmicos. O nível de probabilidade (P) menor do que 0,05 foi usado como critério de significância. A “odds ratio” e o intervalo de confiança (IC) de 95% (KLEINBAUM et al., 1982) foram calculados como uma estimativa de risco relativo e grau de associação.

Resultados

4. Resultados

4.1 Aberrações cromossômicas e sensibilidade ao antitumoral cisplatina

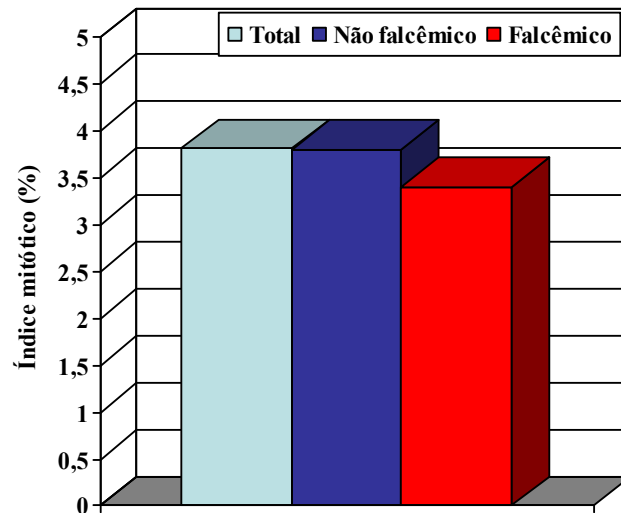
A Figura 4 apresenta os valores médios de índice mitótico, expressos em porcentagem, de todos os indivíduos da amostra, dos indivíduos não falcêmicos e falcêmicos. Os linfócitos do sangue periférico dos indivíduos falcêmicos apresentaram valores de índice mitótico inferiores aos encontrados nos linfócitos dos indivíduos não falcêmicos, tanto nas culturas sem tratamento como nas culturas tratadas com o antitumoral cisplatina. Entretanto, apenas nas culturas tratadas com a cisplatina esta redução do índice mitótico foi estatisticamente significativa ($p < 0,05$), quando comparados os falcêmicos e não falcêmicos.

A distribuição dos diferentes tipos de aberrações cromossômicas, o total de aberrações cromossômicas e o número de metáfases alteradas encontrados nos linfócitos do sangue periférico de todos os indivíduos da amostra, nos indivíduos não falcêmicos e falcêmicos estão representados na Tabela 4. O total de aberrações cromossômicas foi significativamente maior nos indivíduos falcêmicos em comparação com os indivíduos não falcêmicos (4,03 e 1,26, respectivamente), assim como também foi estatisticamente significativa a diferença no número de metáfases alteradas entre os não falcêmicos e falcêmicos (1,10 e 3,63, respectivamente) (Tabela 4). Os tipos de aberrações encontradas com maior frequência em ambos os grupos foram as quebras, tanto cromatídicas quanto cromossômicas, seguidas dos “gaps”.

Nas culturas de linfócitos do sangue periférico tratadas *in vitro* com o antitumoral cisplatina (0,5 µg/mL) o total de aberrações cromossômicas e o número de metáfases alteradas nos indivíduos falcêmicos (12,31 e 10,33, respectivamente) foram significativamente maiores do que nos indivíduos não falcêmicos (9,0 e 7,37, respectivamente) (Tabela 5). Novamente, os principais tipos de aberrações encontradas em

ambos os grupos foram as quebras, tanto cromatídicas quanto cromossômicas, seguidas dos “gaps” e rearranjos complexos.

(A)



(B)

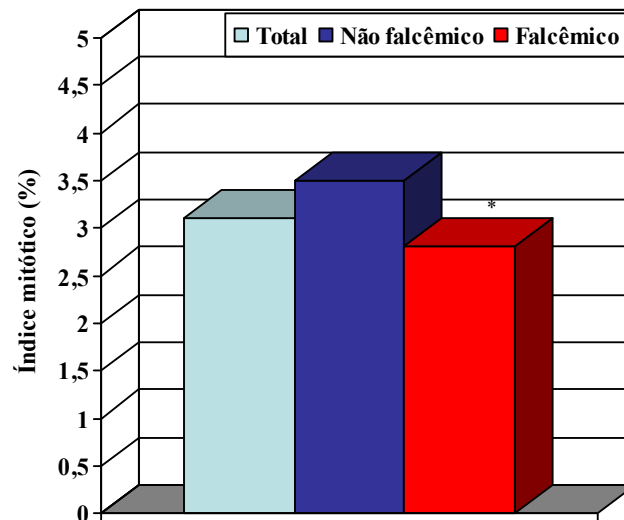


Figura 4. Valores médios de índice mitótico, expressos em porcentagem, calculados em linfócitos do sangue periférico de indivíduos totais da amostra ($n=30$), não falcêmicos ($n=15$) e falcêmicos ($n=15$). Índice mitótico nas culturas sem tratamento (A) e (B) nas culturas tratadas *in vitro* com o antitumoral cisplatina ($0,5 \mu\text{g/mL}$). Foram analisadas 2000 células/indivíduo. *Estatisticamente diferente do grupo não falcêmico (Mann-Whitney $p<0,05$).

Tabela 4. Distribuição dos diferentes tipos de aberrações cromossômicas e metáfases alteradas, expressos em 100 células, em linfócitos do sangue periférico de indivíduos não falcêmicos e falcêmicos

Indivíduos	Aberrações Cromossômicas					Total	MA
	Ctg	Chg	Ctb	Chb	RR	± DP	± DP
Total (n=30)	0,13	0,06	1,51	0,91	0,01	2,73 ± 2,19	2,36 ± 2,16
Não falcêmicos (n=15)	0,01	0,01	0,35	0,25	0	1,26 ± 0,96	1,10 ± 0,18
Falcêmicos (n=15)	0,11	0,05	1,16	0,66	0,01	4,20 ± 3,63*	3,63 ± 3,18*

Ctg="gap" cromatídico, Chg="gap" cromossômico, Ctb=quebra cromatídica, Chb=quebra cromossômica, RR=rearranjo (figura quadrirradial, trirradial, anel e dicêntrico), MA=metáfases alteradas, DP=desvio padrão. *Estatisticamente diferente do grupo de indivíduos não falcêmicos (Mann-Whitney p<0,05)

Tabela 5. Distribuição dos diferentes tipos de aberrações cromossômicas e metáfases alteradas, expressos em 100 células, em linfócitos do sangue periférico de indivíduos não falcêmicos e falcêmicos tratados *in vitro* com o antitumoral cisplatina (0,5 µg/mL)

Indivíduos	Aberrações Cromossômicas					Total	MA
	Ctg	Chg	Ctb	Chb	RR	± DP	± DP
Total (n=30)	0,16	0,26	6,40	2,06	0,23	10,56 ± 5,01	9,03 ± 3,67
Não falcêmicos (n=15)	0,06	0	5,66	0,06	0,33	9,00 ± 4,05	7,37 ± 2,60
Falcêmicos (n=15)	0,26	0,53	7,13	4,06	0,13	12,31 ± 5,51*	10,33 ± 4,18*

Ctg="gap" cromatídico, Chg="gap" cromossômico, Ctb=quebra cromatídica, Chb=quebra cromossômica, RR=rearranjo (figura quadrirradial, trirradial, anel e dicêntrico), MA=metáfases alteradas, DP=desvio padrão. *Estatisticamente diferente do grupo de indivíduos não falcêmicos (Mann-Whitney p<0,05)

Para determinar a sensibilidade genotóxica nos linfócitos tratados *in vitro* com o antitumoral cisplatina, foi realizada a análise do número de quebras/célula (somatória das quebras cromatídicas e cromossômicas). A Tabela 6 apresenta a comparação do número médio de quebras/células no total de indivíduos da amostra, nos indivíduos não falcêmicos e falcêmicos, obtido nos linfócitos sem qualquer tratamento e com a adição do agente antitumoral. O número médio de quebras/célula nos linfócitos de indivíduos falcêmicos foi significativamente maior do que o encontrado nos não falcêmicos ($p < 0,05$), independente da presença da cisplatina nas culturas.

A Figura 5 apresenta a distribuição em quatro classes: 0 - 0,04; 0,05 - 0,09; 0,10 - 0,14 e 0,15 - 0,30 das quebras/célula observadas nos indivíduos totais da amostra, nos indivíduos não falcêmicos e falcêmicos. Nas culturas sem tratamento, todos os indivíduos não falcêmicos encontraram-se na categoria de 0 – 0,04 quebras/célula, enquanto encontramos dois indivíduos falcêmicos na categoria de 0,05 – 0,09 e um falcêmico entre 0,10 – 0,14 quebras/célula. Quando os linfócitos foram tratados *in vitro* com o antitumoral cisplatina, dez indivíduos não falcêmicos apresentaram entre 0,05 – 0,09 quebras/célula, três entre 0,10 – 0,14 e um entre 0,15 – 0,30 quebras/célula. Os indivíduos falcêmicos foram encontrados em todas as categorias, sendo seis indivíduos entre 0,10 – 0,14, o dobro do encontrado entre os não falcêmicos, e quatro indivíduos entre 0,14 – 0,30 quebras/célula, comparado com apenas um não falcêmico na mesma categoria. Estes dados não foram submetidos à análise estatística, pelo pequeno número de indivíduos encontrado em cada categoria.

Tabela 6. Número médio de quebras/células em linfócitos do sangue periférico de indivíduos não falcêmicos e falcêmicos, sem qualquer tratamento ou tratados *in vitro* com o antitumoral cisplatina (0,5 µg/mL)

Indivíduos	Média de quebras/célula ± DP	Média de quebras/célula com cisplatina ± DP
Total (n=30)	0,02 ± 0,01	0,09 ± 0,04
Não falcêmico (n=15)	0,02 ± 0,01	0,08 ± 0,03 [#]
Falcêmico (n=15)	0,07 ± 0,05 [*]	0,112 ± 0,04 ^{*,†}

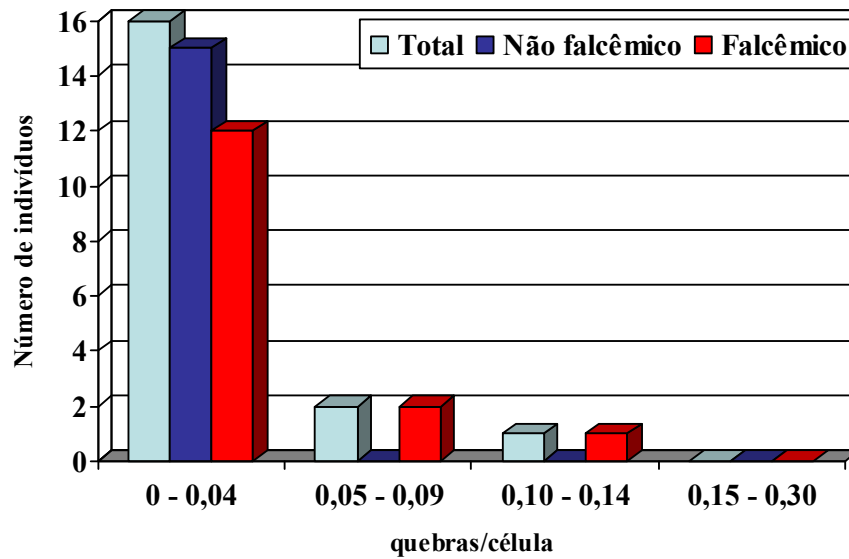
Foram analisadas quebras cromatídicas e cromossômicas.

^{*}Estatisticamente diferente do grupo de indivíduos não falcêmicos (Mann-Whitney p<0,05)

[#]Estatisticamente diferente do grupo não falcêmico sem tratamento com cisplatina (Mann-Whitney p<0,05)

[†]Estatisticamente diferente do grupo falcêmico sem tratamento com cisplatina (Mann-Whitney p<0,05)

(A)



(B)

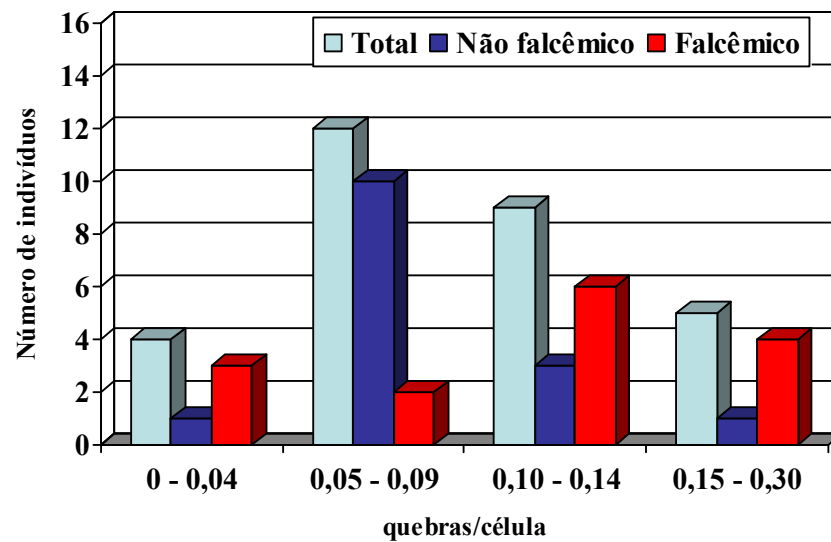


Figura 5. Distribuição do número de quebras/célula encontrado na análise de linfócitos do sangue periférico de indivíduos totais da amostra (n=30) e dos indivíduos não falcêmicos (n=15) ou com anemia falciforme (n=15), sem qualquer tratamento (A) e tratados *in vitro* por 48 h com o antitumoral cisplatina (0,5 $\mu\text{g/mL}$) (B). Valor de p não calculado devido a número insuficiente em cada classe.

4.2 Análises dos polimorfismos genéticos

No polimorfismo *MspI* do gene de reparo *XRCC1*, a distribuição genotípica para os códon 194 e 399 dos indivíduos não falcêmicos está apresentada na Tabela 7. Todos os indivíduos da amostra apresentaram genótipo homozigoto selvagem para o códon 194 (*Arg/Arg*), enquanto que para o códon 399 houve a presença dos genótipos homozigoto para o alelo selvagem (*Arg/Arg*), heterozigoto (*Arg/Gln*) e para o alelo homozigoto polimórfico (*Gln/Gln*).

Na Tabela 8 observa-se que apenas um indivíduo falcêmico apresentou o genótipo heterozigoto (*Arg/Trp*), enquanto os demais indivíduos apresentaram o genótipo homozigoto selvagem (*Arg/Arg*) para o códon 194. Não foram encontrados indivíduos falcêmicos com o genótipo homozigoto polimórfico (*Trp/Trp*). Para o códon 399, os indivíduos apresentaram genótipos homozigoto selvagem (*Arg/Arg*), heterozigoto (*Arg/Gln*) e homozigoto polimórfico (*Gln/Gln*).

De acordo com os dados da Tabela 9, nota-se que mesmo não havendo diferença estatisticamente significativa para o polimorfismo do códon 399 *Gln* entre os indivíduos falcêmicos e não falcêmicos observa-se uma frequência maior de indivíduos falcêmicos homozigotos polimórficos (13,3%), em comparação com indivíduos não falcêmicos (6,7%). Por outro lado, observa-se uma frequência maior do genótipo heterozigoto (*Arg/Gln*) entre os indivíduos não falcêmicos (46,7%), quando comparados com os indivíduos falcêmicos (20,0%), conferindo uma frequência alélica para o polimorfismo 399 *Gln* maior entre os não falcêmicos (0,30) do que entre os falcêmicos (0,23), entretanto, estas diferenças não foram estatisticamente significativas ($p > 0,05$).

A distribuição dos alelos para o gene *XRCC1* esteve em equilíbrio de Hardy-Weinberg para os indivíduos falcêmicos ($\chi^2 = 0,03$ para 194 *Trp* e $\chi^2 = 2,98$ para 399 *Gln*) e para os não falcêmicos ($\chi^2 = 0,21$ para 399 *Gln*). O equilíbrio de Hardy-Weinberg não pôde

ser calculado para o polimorfismo *194Trp*, entre os não falcêmicos devido à ausência de indivíduos heterozigotos e homozigotos polimórficos.

Tabela 7. Identificação dos polimorfismos do gene de reparo do DNA *XRCC1* em indivíduos não falcêmicos

INDIVÍDUOS NÃO FALCÊMICOS	POLIMORFISMOS DO GENE DE REPARO <i>XRCC1</i>	
	CÓDON 194	CÓDON 399
1C	<i>Arg/Arg</i>	<i>Arg/Gln</i>
2C	<i>Arg/Arg</i>	<i>Arg/Gln</i>
3C	<i>Arg/Arg</i>	<i>Arg/Gln</i>
4C	<i>Arg/Arg</i>	<i>Arg/Gln</i>
5C	<i>Arg/Arg</i>	<i>Gln/Gln</i>
6C	<i>Arg/Arg</i>	<i>Arg/Arg</i>
7C	<i>Arg/Arg</i>	<i>Arg/Gln</i>
8C	<i>Arg/Arg</i>	<i>Arg/Arg</i>
9C	<i>Arg/Arg</i>	<i>Arg/Gln</i>
10C	<i>Arg/Arg</i>	<i>Arg/Arg</i>
11C	<i>Arg/Arg</i>	<i>Arg/Arg</i>
12C	<i>Arg/Arg</i>	<i>Arg/Arg</i>
13C	<i>Arg/Arg</i>	<i>Arg/Gln</i>
14C	<i>Arg/Arg</i>	<i>Arg/Arg</i>
15C	<i>Arg/Arg</i>	<i>Arg/Arg</i>

C = indivíduos controle sem anemia falciforme; *Arg/Arg* = homozigoto para o alelo selvagem; *Arg/Gln* = heterozigoto; *Gln/Gln* = homozigoto para o alelo polimórfico.

Tabela 8. Identificação dos polimorfismos do gene de reparo do DNA *XRCC1* em indivíduos falcêmicos

INDIVÍDUOS FALCÊMICOS	POLIMORFISMOS DO GENE DE REPARO <i>XRCC1</i>	
	CÓDON 194	CÓDON 399
1AF	<i>Arg/Arg</i>	<i>Arg/Arg</i>
2AF	<i>Arg/Trp</i>	<i>Arg/Arg</i>
3AF	<i>Arg/Arg</i>	<i>Arg/Gln</i>
4AF	<i>Arg/Arg</i>	<i>Arg/Arg</i>
5AF	<i>Arg/Arg</i>	<i>Arg/Arg</i>
6AF	<i>Arg/Arg</i>	<i>Arg/Arg</i>
7AF	<i>Arg/Arg</i>	<i>Gln/Gln</i>
8AF	<i>Arg/Arg</i>	<i>Arg/Arg</i>
9AF	<i>Arg/Arg</i>	<i>Arg/Arg</i>
10AF	<i>Arg/Arg</i>	<i>Gln/Gln</i>
11AF	<i>Arg/Arg</i>	<i>Arg/Gln</i>
12AF	<i>Arg/Arg</i>	<i>Arg/Gln</i>
13AF	<i>Arg/Arg</i>	<i>Arg/Arg</i>
14AF	<i>Arg/Arg</i>	<i>Arg/Arg</i>
15AF	<i>Arg/Arg</i>	<i>Arg/Arg</i>

AF = indivíduos com anemia falciforme; *Arg/Arg* = homozigoto para o alelo selvagem; *Arg/Trp* e *Arg/Gln* = heterozigotos; *Gln/Gln* = homozigoto para o alelo polimórfico.

Tabela 9. Distribuição das frequências genótípicas e alélicas dos polimorfismos do gene *XRCC1* em indivíduos falcêmicos e não falcêmicos

LOCUS	GENÓTIPO	NÚMERO (%)		OR (95% IC)	P
		Falcêmicos	Não Falcêmicos		
XRCC1 194 (C/T) <i>MspI</i>	<i>Arg/Arg</i>	14/15 (93,3)	15/15 (100,0)	1,0 (referência)	
	<i>Arg/Trp</i>	1/15 (6,7)	0/15 (0,0)	0,31 (0,01-8,3)	1,00
	<i>Trp/Trp</i>	0/15 (0,0)	0/15 (0,0)	_*	_*
	<i>Arg/Trp + Trp/Trp</i>	1/15 (6,7)	0/15 (0,0)	0,31 (0,01-8,3)	1,00
	Alelos				
	<i>Arg</i>	0,97	1,00	-	
XRCC1 399 (G/A) <i>MspI</i>	<i>Trp</i>	0,03	0,00	-	1,00
	<i>Arg/Arg</i>	10/15 (66,7)	7/15 (46,7)	1,0 (referência)	
	<i>Arg/Gln</i>	3/15 (20,0)	7/15 (46,7)	3,33 (0,6-17,6)	0,24
	<i>Gln/Gln</i>	2/15 (13,3)	1/15 (6,7)	0,71 (0,05-9,5)	1,00
	<i>Arg/Gln + Gln/Gln</i>	5/15 (33,3)	8/15 (53,3)	2,29 (0,5-10,0)	0,46
	Alelos				
	<i>Arg</i>	0,77	0,70	-	
	<i>Gln</i>	0,23	0,30	-	0,77

Arg/Arg = homozigoto para o alelo selvagem; *Arg/Trp* e *Arg/Gln* = heterozigotos; *Trp/Trp* e *Gln/Gln* = homozigotos para o alelo polimórfico. OR = “odds ratio”; IC = intervalo de confiança; P = os valores foram calculados pelo teste de probabilidade exato de Fisher.

*OR não calculada devido a número insuficiente.

4.3 Influência dos polimorfismos sobre as aberrações cromossômicas

A Tabela 10 apresenta os valores médios de aberrações cromossômicas, número de metáfases alteradas e sua distribuição de acordo com o polimorfismo do códon *194Trp* do gene de reparo *XRCCI* nos indivíduos totais da amostra, nos indivíduos não falcêmicos e falcêmicos. Devido à ausência de indivíduos heterozigotos e homozigotos polimórficos, não foi possível a análise estatística dos resultados e a determinação da influência do polimorfismo do códon *194Trp* sobre a indução dos danos cromossômicos em linfócitos das culturas não tratadas, nem das culturas tratadas com o antitumoral cisplatina (Tabela 11).

Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre os totais de aberrações cromossômicas e números de metáfases alteradas associados com a distribuição do polimorfismo do códon *399Gln* entre os indivíduos falcêmicos e não falcêmicos, tanto para as culturas de linfócitos tratadas, como para as células sem tratamento com o antitumoral cisplatina (Tabelas 12 e 13). Entretanto, foi observada uma tendência de aumento no total de aberrações cromossômicas nos indivíduos com o genótipo heterozigoto (*Arg/Gln*), indicando que a presença do alelo *399Gln* pode estar associada com frequências mais altas de danos cromossômicos.

Quando foi avaliada apenas a frequência de quebras/célula (excluindo-se os “gaps” e os rearranjos complexos), nas culturas sem tratamento ou submetidas ao tratamento *in vitro* com o antitumoral cisplatina, também não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os não falcêmicos e falcêmicos associadas à presença dos genótipos polimórficos *194Trp* ou *399Gln* (Figura 6).

Tabela 10. Polimorfismos do códon 194 do gene de reparo *XRCCI*, média das aberrações cromossômicas (AC) e média das metáfases alteradas (MA) observadas em linfócitos do sangue periférico de indivíduos não falcêmicos e falcêmicos

População	Parâmetro	<i>Arg/Arg</i>	<i>Arg/Trp</i>	<i>Trp/Trp</i>	P
Total (<i>n</i> =30)	<i>N</i>	29	1	0	
	AC	5,24 ± 4,68	7,00	-	*
	MA	4,65 ± 5,31	7,00	-	*
Não falcêmico (<i>n</i> =15)	<i>N</i>	15	0	0	
	AC	2,53 ± 1,92	-	-	*
	MA	2,20 ± 1,56	-	-	*
Falcêmico (<i>n</i> =15)	<i>N</i>	14	1	0	
	AC	8,14 ± 8,31	7,00	-	*
	MA	7,28 ± 6,61	7,00	-	*

* Valor de p não calculado devido a número insuficiente.

Tabela 11. Polimorfismos do códon 194 do gene de reparo *XRCCI*, média das aberrações cromossômicas (AC) e média das metáfases alteradas (MA) induzidas pelo tratamento com o antitumoral cisplatina (0,5 µg/ml) em linfócitos do sangue periférico de indivíduos não falcêmicos e falcêmicos

População	Parâmetro	<i>Arg/Arg</i>	<i>Arg/Trp</i>	<i>Trp/Trp</i>	P
Total (<i>n</i> =30)	<i>N</i>	29	1	0	
	AC	10,56 ± 5,01	11,00	-	*
	MA	9,03 ± 3,67	11,00	-	*
Não falcêmico (<i>n</i> =15)	<i>N</i>	15	0	0	
	AC	9,00 ± 4,05	-	-	*
	MA	7,73 ± 2,60	-	-	
Falcêmico (<i>n</i> =15)	<i>N</i>	14	1	0	
	AC	12,21 ± 5,71	11,00	-	*
	MA	10,28 ± 4,33	11,00	-	*

* Valor de p não calculado devido a número insuficiente.

Tabela 12. Polimorfismos do códon 399 do gene de reparo *XRCC1*, média das aberrações cromossômicas (AC) e média das metáfases alteradas (MA) observadas em linfócitos do sangue periférico de indivíduos não falcêmicos e falcêmicos

Indivíduos	Parâmetro	<i>Arg/Arg</i>	<i>Arg/Gln</i>	<i>Gln/Gln</i>	P
Total (n=30)	<i>N</i>	17	10	3	
	AC	4,94 ± 4,77	6,3 ± 9,28	4,00 ± 3,46	0,248
	MA	4,59 ± 4,16	5,3 ± 7,11	3,66 ± 3,21	0,378
Não falcêmico (n=15)	<i>N</i>	7	7	1	
	AC	2,71 ± 1,60	2,70 ± 2,21	0	0,500
	MA	2,14 ± 1,51	2,57 ± 1,57	0	0,329
Falcêmico (n=15)	<i>N</i>	10	3	2	
	AC	6,5 ± 5,54	14,66 ± 15,17	6,00 ± 0,00	0,240
	MA	6,3 ± 5,01	11,66 ± 11,59	5,50 ± 0,70	0,306

Para cada parâmetro, as diferenças entre os polimorfismos *XRCC1* (*Arg/Arg* versus *Arg/Gln+Gln/Gln*) foram calculadas pelo teste de Mann-Whitney.

Tabela 13. Polimorfismos do códon 399 do gene de reparo *XRCC1*, média das aberrações cromossômicas (AC) e média das metáfases alteradas (MA) induzidas pelo tratamento com o antitumoral cisplatina (0,5 µg/ml) em linfócitos do sangue periférico de indivíduos não falcêmicos e falcêmicos

Indivíduos	Parâmetro	<i>Arg/Arg</i>	<i>Arg/Gln</i>	<i>Gln/Gln</i>	P
Total (n=30)	<i>N</i>	17	10	3	
	AC	10,47 ± 4,66	11,50 ± 5,91	8,00 ± 4,35	0,472
	MA	9,23 ± 3,78	11,30 ± 8,39	6,66 ± 2,08	0,259
Não falcêmico (n=15)	<i>N</i>	7	7	1	
	AC	8,00 ± 3,65	11,42 ± 4,46	6,00	0,101
	MA	7,00 ± 2,30	10,42 ± 9,65	6,00	0,330
Falcêmico (n=15)	<i>N</i>	10	3	2	
	AC	12,2 ± 4,66	14,00 ± 9,16	9,00 ± 5,65	0,576
	MA	10,8 ± 3,91	11,00 ± 6,08	7,00 ± 2,82	0,180

Para cada parâmetro, as diferenças entre os polimorfismos *XRCC1* (*Arg/Arg* versus *Arg/Gln+Gln/Gln*) foram calculadas pelo teste de Mann-Whitney.

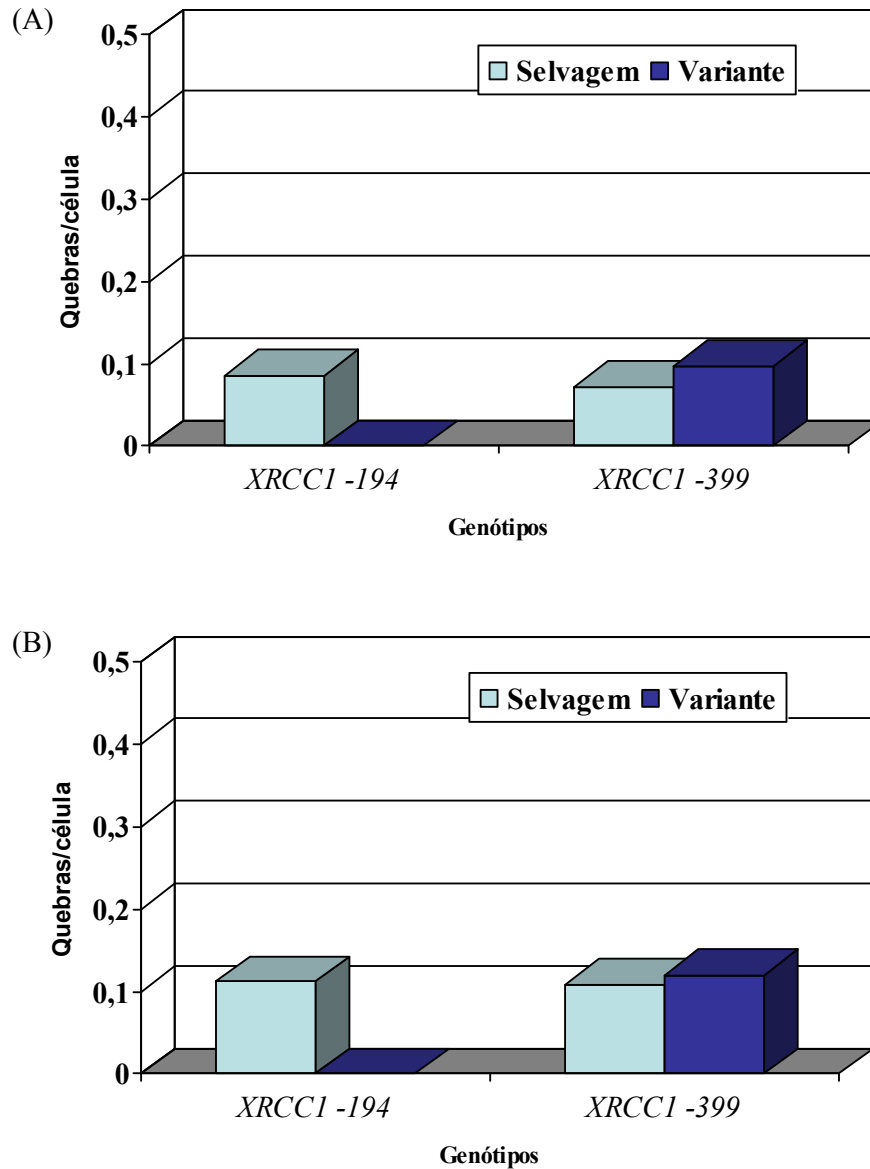


Figura 6. Sensibilidade dos linfócitos humanos ao tratamento com o antitumoral cisplatina (0,5 $\mu\text{g/mL}$) *in vitro*, indicada pela média de quebras/célula em indivíduos não falcêmicos (A) ou com anemia falciforme (B). Os polimorfismos do gene de reparo *XRCC1* para os códons 194 (Selvagem *Arg/Arg*, variante *Arg/Trp* + *Trp/Trp*) e 399 (Selvagem *Arg/Arg*, variante *Arg/Gln* + *Gln/Gln*) não apresentaram diferenças estatisticamente significativas, quando comparados os genótipos dos indivíduos não falcêmicos e falcêmicos e a indução de quebras/célula (Mann-Whitney $p > 0,05$).

Discussão

5. Discussão

5.1. Aberrações cromossômicas e sensibilidade ao antitumoral cisplatina

O presente estudo consistiu na determinação do total de aberrações cromossômicas e número de metáfases alteradas em indivíduos falcêmicos e não falcêmicos, pela análise dos linfócitos do sangue periférico em cultura, sem tratamento ou após o tratamento *in vitro* com o antitumoral cisplatina no teste de sensibilidade genotóxica.

O monitoramento citogenético é uma abordagem simples, do ponto de vista da metodologia empregada, portanto economicamente acessível a vários laboratórios de pesquisa. Entretanto, os testes de aberrações cromossômicas, análise de micronúcleos e trocas entre cromátides irmãs requerem trabalho intensivo e consomem muito tempo, mas estão entre os ensaios mais sensíveis de investigação de mutagenicidade e clastogenicidade. A indução de quebras e outras alterações cromossômicas é uma estimativa confiável para detectar a capacidade de reparo do DNA e o risco de desenvolvimento de neoplasias.

Para os testes de mutagenicidade e genotoxicidade, um sistema citogenético clássico são os linfócitos do sangue periférico humano em cultura (AMARA-MOKRANE et al., 1996). As amostras de linfócitos, escolhidos como o material biológico neste trabalho, estão prontamente acessíveis para estudo e os danos cromossômicos são relativamente de fácil quantificação (SPITZ et al., 1989). Os testes de genotoxicidade/mutagenicidade em linfócitos humanos fornecem avaliação de risco da exposição em seres humano. A mutagênese pode ser definida como a área de pesquisa que estuda as mudanças permanentes no conteúdo ou estrutura do material genético de um organismo. O potencial de risco mutagênico pode ser manifestado como uma mudança herdável de mutações na linhagem germinativa e/ou mutações somáticas conduzindo ao câncer ou outros processos degenerativos crônicos, tais como o envelhecimento. Ensaio e

baterias de testes têm sido desenvolvidos para avaliar os efeitos nos três principais parâmetros de dano genético associados com doença humana: mutação, clastogenicidade e aneuploidia (isto é, alterações numéricas) (RONCADA; VICENTINI; MANTOVANI, 2004).

As técnicas citogenéticas têm sido aplicadas recentemente para detectar o aumento da frequência de aberrações cromossômicas em pacientes com doenças degenerativas, tais como Alzheimer (TRIPPI et al., 2001), Parkinson (MIGLIORI et al., 2002) e em pacientes com diabetes tipo II, comparados com a frequência de danos cromossômicos encontrados em indivíduos sadios (WYATT et al., 2006).

Uma outra abordagem das técnicas citogenéticas é a análise de proliferação celular e de índice mitótico. A regulação do ciclo celular é um processo importante e fundamental, o qual determina que as células em divisão sigam uma progressão ordenada de duplicação do DNA e mitose. Portanto, qualquer distúrbio nestas etapas pode ter implicações importantes no processo de carcinogênese, desde que as células cancerosas têm crescimento independente, ultrapassando passos importantes de controle do ciclo celular (M'BEMBA-MEKA; LEMIEUX; CHAKRABARTI, 2006). Os resultados obtidos no presente estudo mostraram a redução não significativa do valor médio do índice mitótico nos indivíduos falcêmicos, em comparação com os não falcêmicos, e uma redução estatisticamente significativa quando os linfócitos foram tratados *in vitro* com o antitumoral cisplatina.

Esta redução do índice mitótico nos falcêmicos não pode ser justificada por fatores interferentes, tais como o sexo e a idade dos indivíduos da amostra, pois os experimentos foram realizados em doadores pareados por sexo, idade e todos não fumantes. Em relação ao efeito citotóxico do tratamento com a cisplatina, esta redução do índice mitótico ocorreu em ambos os grupos amostrais, mas foi significativa e mais pronunciada nos indivíduos

falcêmicos. A cisplatina, em concentrações acima de 0,3 µg/mL pode reduzir os valores de índice mitótico em linfócitos humanos (ANTUNES et al., 2005). Pode ser sugerido que os linfócitos dos indivíduos falcêmicos apresentaram inibição da divisão pelo aumento da extensão da duração da fase G₂ do ciclo celular. No tratamento com o antitumoral cisplatina, houve um aumento no total de aberrações cromossômicas, que poderia levar ao atraso da divisão celular atribuído a presença dos danos cromossômicos e inibição da síntese de DNA.

Foi observado que os indivíduos falcêmicos da amostra apresentaram um total de aberrações cromossômicas e número de metáfases alteradas estatisticamente maiores do que os valores encontrados entre os não falcêmicos. Nos indivíduos não falcêmicos, o número de metáfases alteradas/100 células ficou entre 0 e 2, o que está de acordo com os dados descrito por Karahalil et al. (2002), que encontraram de 0 a 6 metáfases alteradas na análise de linfócitos do sangue periférico em 18 indivíduos sadios, com idade média de 38 anos e dos sexos masculino ou feminino. Os doadores deste estudo apresentaram média de idade de 25 anos e foram representados por indivíduos do sexo masculino ou feminino.

Os indivíduos falcêmicos apresentaram um aumento no total de danos cromossômicos e maior número de metáfases com aberrações cromossômicas, entre 0 e 12, o qual foi estatisticamente diferente dos não falcêmicos. Esta maior frequência de aberrações cromossômicas poderia ser justificada pelos estudos em pacientes com anemia falciforme, que revelaram depleção nos níveis das enzimas antioxidantes superóxido dismutase e catalase (KLINGS; FARBER, 2001) favorecendo o estresse oxidativo e a instabilidade cromossômica. Se os radicais livres de oxigênio são produzidos em excesso ou se a defesa antioxidante está deficiente, pode ocorrer um aumento da indução de danos oxidativos no material genético. Tais danos incluem as bases modificadas que levam à

falhas durante a duplicação ou ao bloqueio da duplicação da cadeia de DNA (VAN GILS, et al., 2002).

Uma outra possível explicação para o aumento dos danos cromossômicos entre os falcêmicos seria o acúmulo de ferro, por causa das transfusões regulares, que levaria ao acréscimo de radicais livres gerados pela reação de Fenton. O excesso de ferro é potencialmente tóxico, porque as suas reações catalíticas geram espécies reativas de oxigênio, principalmente de radicais superóxidos que são precursores do peróxido de hidrogênio. Como consequência, ocorre o aumento da susceptibilidade aos danos oxidativos, resultando em mutações, câncer e doenças neurológicas (DE FREITAS; MENEHINI, 2001). Os indivíduos com talassemia, que não utilizaram intervenções terapêuticas com quelantes de ferro, apresentaram aumento dos danos cromossômicos quando os linfócitos foram analisados pelo teste do Cometa (RUF et al., 2003).

Nesta investigação, os pacientes falcêmicos com transfusões nos últimos seis meses não foram incluídos no grupo amostral. Não há dados na literatura sobre a frequência de aberrações cromossômicas em indivíduos com anemia falciforme, para compararmos com os resultados encontrados neste estudo. Como descrito na introdução, o trabalho de Khayat et al. (2004), que encontraram um pequeno aumento de danos cromossômicos em três pacientes com anemia falciforme, serviu de incentivo para a realização desta dissertação, com um número maior de pacientes e voluntários sadios.

No ensaio de sensibilidade genotóxica foi utilizado como indutor das aberrações cromossômicas o antitumoral cisplatina. A cisplatina é um dos fármacos mais potentes usados em quimioterapia (CRUL et al., 1997; WEAVER et al., 2005). Sua principal atividade citotóxica nas células tumorais está baseada na formação de aductos mono-/bifuncionais no DNA, os quais causam ligações cruzadas inter-/intracadeias (QUINTELA-FANDINO et al., 2006). Os aductos do DNA podem causar o bloqueio do ciclo celular,

inibição da duplicação e transcrição do DNA e eventualmente apoptose (BERGS et al., 2006). Este fármaco também é um conhecido agente genotóxico e mutagênico em sistemas *in vitro* e *in vivo*, indutor de trocas entre cromátides irmãs, aberrações cromossômicas e de micronúcleos (ANTUNES et al., 2000; 2005; KRISHNASWAMY; DEWEY, 1993; NEFIC, 2001; OHE et al., 1990).

Tem sido mostrado com frequência, que o ideal para a análise das aberrações cromossômicas *in vitro* seria a utilização das primeiras mitoses, uma vez que nas divisões celulares subsequentes as aberrações podem ser reparadas (BENDER et al., 1988). Assim, as células foram tratadas com a cisplatina 24 horas após o início da cultura, para obtenção de um número suficiente de metáfases para a análise dos danos cromossômicos. A seleção do meio de cultura, o tipo e a concentração do soro bovino fetal estão de acordo com o protocolo de Albertini et al. (2000) para monitorização dos efeitos genotóxicos de agentes carcinogênicos em seres humanos. O uso do sangue periférico total nas culturas está de acordo com Lazutka et al. (2001), que disseram que este procedimento é vantajoso sobre os linfócitos purificados, devido às várias enzimas metabolizadoras de xenobióticos, superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase e algumas oxidases, presentes nos eritrócitos.

Os resultados obtidos mostraram que a cisplatina provocou um aumento significativo no total de aberrações cromossômicas e no número de metáfases alteradas nos indivíduos não falcêmicos e falcêmicos, quando comparado aos valores obtidos nas culturas sem tratamento, que funcionaram como controle negativo. A frequência de danos cromossômicos, após o tratamento com cisplatina, nos linfócitos dos falcêmicos foi estatisticamente superior àquela observada nos linfócitos tratados dos não falcêmicos, evidenciando a possível susceptibilidade cromossômica dos indivíduos com anemia

falciforme. Para confirmar esta hipótese, foi realizada a análise de quebras/célula nos linfócitos de falcêmicos e não falcêmicos.

A proposta do ensaio de sensibilidade genotóxica é a identificação de indivíduos susceptíveis a indução de aberrações cromossômicas, detectados a partir do tratamento dos linfócitos do sangue periférico *in vitro* com reconhecidos agentes clastogênicos, produtores de quebras cromossômicas. A razão entre o número total de quebras e total de células analisadas é um índice que classifica os indivíduos em sensíveis, hipersensíveis ou não sensíveis, de acordo com os critérios preconizados por Hsu et al. (1989; 1991).

Os resultados obtidos mostraram que a cisplatina provocou um aumento significativo no total de quebras cromossômicas e cromatídicas nos indivíduos não falcêmicos e falcêmicos. A frequência de danos cromossômicos após o tratamento com cisplatina nos linfócitos dos falcêmicos foi estatisticamente superior àquela observada nos linfócitos tratados dos não falcêmicos, também quando foi analisada apenas a média de quebras/célula. Entretanto, apesar de eficiente indutor de quebras cromatídicas e cromossômicas, os danos individuais induzidos pela cisplatina não atingiram o valor de referência proposto por Hsu et al. (1989; 1991), que é $>$ ou $<$ do que 0,8 quebras/célula. Assim, os indivíduos da nossa amostra não puderam receber a classificação de sensibilidade.

Foi realizada uma distribuição em quatro categorias, de acordo com os valores de quebra/célula, tanto nos tratamentos com cisplatina quanto nas culturas sem tratamento. Um número maior de indivíduos falcêmicos foi encontrado nas categorias de 0,10 – 0,14 quebras/células nas culturas sem tratamento e entre 0,15 – 0,30 quebras/célula nas culturas tratadas, em comparação com o número de indivíduos não falcêmicos. Estes resultados podem refletir a variabilidade da capacidade de reparo individual, que pode ser atribuída aos polimorfismos genéticos dos genes de reparo do DNA.

Os resultados deste trabalho estão consistentes com a hipótese, previamente proposta, que linfócitos do sangue periférico de indivíduos com anemia falciforme apresentam um aumento no total de aberrações cromossômicas e no número de metáfases alteradas, além de uma maior sensibilidade aos agentes genotóxicos quando comparados com indivíduos não falcêmicos.

5.2. Polimorfismos genéticos e influência sobre as aberrações cromossômicas

A análise dos polimorfismos do gene de reparo do DNA *XRCC1*, códons 194 e 399, foi realizada em uma amostra de 15 indivíduos não falcêmicos e 15 indivíduos falcêmicos, da cidade de Uberaba, localizada na região do Triângulo Mineiro no Estado de Minas Gerais.

Os polimorfismos dos genes que codificam as enzimas de reparo do DNA são os principais responsáveis pelas diferenças inter-individuais na manutenção da integridade do genoma humano, portanto, podem influenciar a susceptibilidade individual para o desenvolvimento do câncer e de outras doenças degenerativas (MOHRENWEISER; JONES, 1998). Os principais genes de reparo estudados são os genes da família *XRCC*, tais como o *XRCC1* e o *XRCC3*, responsáveis pelos reparos de excisão de bases e por recombinação homóloga de ligação cruzada e quebra de fita dupla (AU; SALAMA; SIERRA-TORRES, 2003; GOODE et al., 2002) o *XPB* e *APE1*, correspondentes ao reparo de danos induzidos pelo ultravioleta e raios X, respectivamente (CANALLE et al., 2006) e o *hGG1*, também relacionado ao reparo por excisão de bases de danos oxidativos (LAN et al., 2006). Em estudos epidemiológicos, esses polimorfismos têm sido associados com o risco de vários tipos de câncer, embora os resultados não sejam inteiramente consistentes (STURGIS et al., 1999; ABDEL-RAHMAN et al., 2000; DUELL et al., 2001).

A população brasileira apresenta características diferentes de outras populações com menor frequência de miscigenação, e os brasileiros apresentam grande influência da etnia sobre a distribuição dos polimorfismos de genes do metabolismo de xenobióticos e de reparo do DNA (CANALLE et al., 2004). Nesta investigação, os indivíduos da amostra foram classificados quanto a sua etnia, mas este parâmetro não foi avaliado estatisticamente, devido ao pequeno número amostral de não falcêmicos e falcêmicos. Entretanto, neste estudo, o número amostral de 30 indivíduos é superior aos 18 indivíduos analisados em uma investigação de polimorfismo genético por Karahalil et al. (2002) e aos 27 indivíduos da amostra de Iarmarcovai et al. (2006).

Na presente investigação, quando foi estudado o polimorfismo entre os indivíduos falcêmicos e não falcêmicos para o códon *194Trp*, foi encontrado apenas um indivíduo heterozigoto para o polimorfismo, enquanto todos os outros indivíduos do grupo amostral apresentaram genótipo homozigoto *Arg/Arg*. A frequência dos alelos *Arg* e *Trp* foi 0,97 e 0,03 nos falcêmicos e 1,0 e 0,0 nos não falcêmicos. O pequeno número de indivíduos analisados poderia ser uma justificativa para a ausência do genótipo homozigoto polimórfico (*Trp/Trp*), porém, polimorfismos do gene de reparo *XRCCI* foram verificados na população brasileira confirmando uma frequência bem menor do alelo polimórfico para o códon *194Trp*, sendo sua frequência 0,07 e 0,09 entre os brasileiros descendentes de europeus e de africanos, respectivamente (DUARTE et al, 2005). Os resultados da presente investigação estão de acordo com os dados descritos por Canalle et al (2006), que analisaram uma amostra de 364 brasileiros e descreveram as seguintes frequências para o alelo *Trp*: 0,06 em negros, 0,11 em mulatos, 0,09 quando se considerou os não brancos e 0,09 para os brancos.

Outras publicações têm mostrado que em 530 indivíduos caucasianos analisados pelo projeto CancerRiskBiomarkers na Noruega, apenas um apresentou o genótipo *Trp/Trp*

no códon 194 do gene *XRCC1* e a maioria possuía o genótipo *Arg/Arg* (SKJELBRED et al., 2006). Quanto à frequência do alelo *399Gln*, foram encontrados os valores de 0,23 para os não falcêmicos e 0,30 para os falcêmicos. Estes dados também estão de acordo com àqueles publicados por Canalle et al. (2006) que descreveram 0,26 em negros, 0,27 em mulatos, 0,27 em não brancos e 0,28 em brancos. Em um estudo sobre a associação de polimorfismos de gene de reparo do DNA e susceptibilidade ao câncer de mama familiar em mulheres brasileiras, Dufloth et al. (2005) encontraram em 175 pacientes, apenas 17 com o alelo *Gln399*.

Os polimorfismos do gene *XRCC1* encontrados entre os falcêmicos e não falcêmicos não apresentaram diferenças estatisticamente significativas. Mas, foi constatada uma frequência maior do genótipo heterozigoto (*Arg/Gln*) entre os indivíduos não falcêmicos (46,7%), quando comparados com os indivíduos falcêmicos (20,0%). A maioria dos indivíduos com câncer estudados pelo projeto CancerRiskBiomarkers na Noruega apresentaram o genótipo heterozigoto *Arg/Gln* (SKJELBRED et al., 2006). Rzeszowska-Wolny et al. (2005) observaram anteriormente que a presença do alelo *Gln* aumentava a velocidade de reparo em linfócitos submetidos ao tratamento com as radiações ionizantes, quando comparados aos homozigotos *Arg/Arg*.

As evidências experimentais demonstraram que a proteína XRCC1 é capaz de se acoplar com a enzima DNA ligase para corrigir os espaços ou falhas resultantes do reparo de excisão de bases. A redução dos níveis ou alterações funcionais desta proteína poderia inibir parcial ou totalmente o reparo do DNA (BREM; HALL, 2005). Assim, polimorfismos neste gene poderiam estar associados com a ausência de reparo ou reparo incompleto do DNA, aumentando a instabilidade genômica e como consequência levando à formação de aberrações cromossômicas, indução de mutações e radiosensibilidade (CHUNG et al., 2006).

Estudos têm avaliado o impacto dos polimorfismos de único nucleotídeo dos genes que codificam as enzimas de reparo do DNA no risco do desenvolvimento de câncer (MOHRENWEISER; WILSON; JONES, 2003; AU, 2006) e nos ensaios com biomarcadores citogenéticos de efeito (AU; SALAMA; SIERRA-TORRES, 2003; VODICKA et al., 2004; ZIJNO et al., 2006). A determinação da influência dos polimorfismos genéticos sobre a indução de aberrações cromossômicas é um processo muito complexo. Vários polimorfismos das enzimas de metabolismo de xenobióticos, proteínas de reparo do DNA e do metabolismo do ácido fólico parecem ter algum tipo de associação com a indução de danos cromossômicos (NORPPA et al., 2006).

O presente estudo também analisou a associação entre o genótipo do gene de reparo *XRCC1* e as alterações cromossômicas encontradas nos linfócitos do sangue periférico de indivíduos com anemia falciforme e indivíduos não falcêmicos, associação esta não relatada na literatura. Nas culturas sem tratamento ou submetidas ao tratamento com o antitumoral cisplatina *in vitro*, assim como na análise de quebras/célula no ensaio de sensibilidade genotóxica, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os não falcêmicos e falcêmicos associadas à presença dos genótipos polimórficos *194Trp* ou *399Gln*. Entretanto, foi observado uma tendência de aumento no total de aberrações cromossômicas nos indivíduos falcêmicos com o genótipo heterozigoto (*Arg/Gln*), indicando que a presença do alelo *399Gln* poderia estar associada com frequências mais altas de danos cromossômicos.

As investigações que procuram uma associação entre polimorfismos do DNA e biomarcadores citogenéticos são recentes, com poucas publicações até o momento e muitas vezes revelando resultados contraditórios. O número médio de quebras/célula em indivíduos com o genótipo homozigoto *His/His* do códon 280 do gene *XRCC1* apresentou um aumento, quando comparado com os indivíduos portadores do genótipo *Arg/Arg*, após

o tratamento com o antitumoral bleomicina, sendo que os polimorfismos dos códons 194 e 399 não apresentaram qualquer associação (TUIMALA et al., 2002). Rossit et al. (2002) não encontraram relação entre o polimorfismo *194Trp* e o risco de cirrose no fígado e verificaram a raridade do genótipo homozigoto encontrado em apenas um indivíduo de uma amostra de 97 pacientes e 96 controles. Entretanto, a presença do alelo *399Gln* foi associada a um aumento no risco de desenvolvimento de cirrose em indivíduos com idade superior a 45 anos.

Au; Salama; Sierra-Torres (2003) verificaram a interação do polimorfismo *399Gln* do gene *XRCC1* com a indução de grandes deleções em cromossomos humanos induzidas pelos raios X. Angelini et al., (2005) demonstraram que o polimorfismo do gene *XRCC1* foi positivamente correlacionado com o aumento do número de anomalias cromossômicas encontradas nos linfócitos do sangue periférico de indivíduos ocupacionalmente expostos às doses baixas de radiações ionizantes.

Tem sido relatado que os polimorfismos em genes de reparo podem aumentar ou reduzir a susceptibilidade ao desenvolvimento de câncer e também ao tratamento com os agentes quimioterápicos. As pacientes com o polimorfismo homozigoto *Gln/Gln* para o códon 399 do gene *XRCC1* apresentaram melhor resposta ao tratamento quimioterápico do câncer cervical com os derivados de platina (CHUNG et al., 2006). Já nos resultados de Las Penas et al. (2006), o polimorfismo do gene *XRCC1* não teve qualquer interferência na resposta dos pacientes com câncer de pulmão em relação ao tratamento com a cisplatina.

Por outro lado, muitas investigações não encontraram qualquer associação entre a presença de polimorfismos no gene *XRCC1* e o aumento de danos cromossômicos. Estes resultados contraditórios descritos na literatura poderiam ser justificados pelas diferenças de idade e hábito tabagista entre os indivíduos estudados, etnia e tamanho dos grupos amostrais (SKJELBRED et al., 2006).

Verificando a influência dos polimorfismos de genes de reparo em biomarcadores citogenéticos em linfócitos periférico de indivíduos saudáveis, Zijno et al., (2006) não encontraram associação entre polimorfismos dos genes *XRCCI*, *XRCC3* e *NAT2* e a indução de trocas de cromátides irmãs. Apenas um discreto efeito não significativo foi observado na frequência de micronúcleos, com um decréscimo de 23% em células micronucleadas no grupo de indivíduos que possuíam pelo menos um alelo polimórfico para o códon 280 do gene *XRCCI*, em comparação com indivíduos homozigotos, sugerindo um possível efeito protetor do polimorfismo do códon 280 sobre os danos genotóxicos. A frequência de micronúcleos em linfócitos binucleados não apresentou qualquer correlação significativa com a presença do polimorfismo *399Gln* do gene *XRCCI* em soldadores e indivíduos controles sem exposição ocupacional (IARMARCOVAI et al., 2006).

No gene *XRCCI* os polimorfismos dos códons 194 e 280 estão localizados próximos a duas seqüências mediando interações de proteína-proteína com a polimerase poli(ADP-ribose) e a DNA polimerase beta. Assim, os alelos variantes podem codificar uma proteína XRCC1 alterada, resultando em afinidade aumentada ou diminuída para outras proteínas e modificar a capacidade de reparo (TUIMALA et al., 2002; KIURU et al., 2005).

Nos polimorfismos *His280* e *Gln399* do gene *XRCCI* é esperado que as proteínas apresentem alterações funcionais, desde que ambas interagem com o domínio envolvido com outros componentes do reparo de excisão de bases. Contudo, muitas investigações não conseguem comprovar este fato, principalmente pela dificuldade de revelar os efeitos sutis das variações genéticas quando a sua expressão fenotípica é baixa. Teoricamente, esta limitação pode ser superada pela análise de um grande número de indivíduos e com a

associação dos resultados obtidos na análise simultânea de vários polimorfismos em genes diferentes (ZIJNO et al., 2006).

Os resultados obtidos na análise dos polimorfismos do gene *XRCCI* e sua associação com a indução de danos cromossômicos e instabilidade genética em pacientes com anemia falciforme mostraram a tendência de aumento de aberrações cromossômicas em indivíduos com pelo menos um alelo *Gln399*. Este estudo é inédito em pacientes com anemia falciforme, embora o pequeno número amostral não tenha permitido que todas as análises estatísticas fossem realizadas, tais como a associação entre a etnia e sexo. Contudo, quanto maior a quantidade e qualidade das informações sobre os aspectos envolvidos nos mecanismos genéticos da anemia falciforme, mais rápido e mais eficiente serão as intervenções terapêuticas que buscam melhorar a saúde e qualidade de vida destes pacientes.

Conclusões

6. Conclusões

O presente estudo investigou a hipótese de que os indivíduos com anemia falciforme apresentam maior número de metáfases com aberrações cromossômicas e maior susceptibilidade de indução de danos cromossômicos no ensaio de sensibilidade a agentes genotóxicos com o antitumoral cisplatina, quando comparados com os indivíduos não falcêmicos. Também foi realizada a determinação dos polimorfismos do gene de reparo *XRCC1* em ambos os grupos experimentais e sua associação com os biomarcadores citogenéticos.

De acordo com os resultados obtidos podemos concluir que:

- Os indivíduos com anemia falciforme apresentam uma diminuição no valor médio do índice mitótico nos linfócitos do sangue periférico após o tratamento com a cisplatina, quando comparados com os não falcêmicos.
- Os indivíduos com anemia falciforme apresentam um aumento estatisticamente significativo no total de aberrações cromossômicas e número de metáfases alteradas nos linfócitos do sangue periférico, quando comparados com indivíduos não falcêmicos.
- No ensaio de sensibilidade cromossômica os falcêmicos apresentaram maiores valores de quebra/célula do que os não falcêmicos, nos tratamentos com a cisplatina.
- Os polimorfismos do gene de reparo *XRCC1* para os códons 194 e 399 não apresentam diferenças estatisticamente significativas, quando comparados os genótipos dos indivíduos não falcêmicos e falcêmicos.
- Não foi encontrada associação estatisticamente significativa entre os polimorfismos do gene de reparo *XRCC1* para os códons 194 e 399 e o total

de aberrações cromossômicas, o número de metáfases alteradas e a indução de quebras/célula.

Portanto, os resultados obtidos confirmaram que os indivíduos falcêmicos apresentam aumento dos danos cromossômicos nos linfócitos do sangue periférico humano e são mais susceptíveis no ensaio de sensibilidade genotóxica do que os não falcêmicos. Ainda há uma tendência de aumento dos danos cromossômicos nos indivíduos com o genótipo heterozigoto para o códon *Gln399* do gene de reparo *XRCC1*.

Resumo e Abstract

7. Resumo

Análise Cromossômica dos Linfócitos do Sangue Periférico e dos Polimorfismos do Gene de Reparo do DNA *XRCC1* em Indivíduos com Anemia Falciforme

A anemia falciforme é uma desordem causada pela substituição de um único nucleotídeo no gene da β -globina. A heterogeneidade clínica observada nos pacientes com anemia falciforme tem sido atribuída aos fatores ambientes e genéticos. Os pacientes com anemia falciforme estão sujeitos ao aumento do estresse oxidativo, especialmente nas crises vaso-oclusivas e síndrome torácica aguda. Outra possível causa do estresse oxidativo na anemia falciforme são as altas concentrações de ferro no plasma dos pacientes. O aumento do estresse oxidativo poderia ser um fator de risco relevante para a mutagênese e carcinogênese. Estudos sobre a frequência de aberrações cromossômicas em linfócitos de pacientes com anemia falciforme não foram relatados até o momento. Para contribuir com o entendimento do papel dos diferentes biomarcadores e sua relação com as manifestações clínicas extremamente variáveis na anemia falciforme, nós investigamos a frequência de danos cromossômicos e a distribuição do gene de reparo do DNA *XRCC1* e sua influência sobre os danos cromossômicos em pacientes e voluntários sadios. As amostras de sangue foram obtidas de 15 paciente e 15 voluntários sadios. Os resultados mostram que os pacientes apresentam um marcado decréscimo nos valores de índice mitótico, comparados com os voluntários e um aumento na porcentagem de metáfases com aberrações cromossômicas. No ensaio de sensibilidade genotóxica, os danos cromossômicos induzidos pela cisplatina nos linfócitos dos pacientes foram significativamente maiores do que a frequência mensurada nos voluntários sadios. As frequências alélicas para o *194Trp* e *399Gln* não foram estatisticamente diferentes entre pacientes e voluntários. Não existiram evidências da influência de qualquer dos alelos estudados sobre a resposta de aberrações

cromossômicas ou aumento na sensibilidade do DNA, exceto uma tendência de aumento nos indivíduos *Arg/Gln*.

8. Abstract

Cytogenetic Analysis in Peripheral Blood Lymphocytes and *XRCC1* DNA Repair

Gene Polymorphisms in Individuals with Sickle Cell Anaemia

Sickle cell disease is an inherited disorder caused by a single nucleotide substitution in the β -globin gene. The clinical heterogeneity observed in sickle cell disease patients has been attributed to environmental and genetic factors. Patients with sickle cell disease are subjected to increased oxidative stress, particularly during vaso-occlusive crises and acute chest pain. Another possible cause of the oxidative stress in sickle cell diseases is the high concentrations of iron in the patients' plasma. The increase in oxidative stress could be a relevant risk factor for mutagenesis and carcinogenesis. Studies on the frequency of chromosomal aberrations in cultured lymphocytes from sickle cell disease patients have not been reported so far. In order to contribute to the understanding of the role of the different biomarkers and their relationship with the extremely variable clinical manifestation of sickle cell disease, we investigated the frequency of chromosome damage in patients and the distribution of the DNA repair gene *XRCC1* and its influence on chromosomal damage in sickle cells patients and healthy volunteers. Human blood samples were obtained from 15 patients and 15 healthy volunteers. The results show that patients presented a marked decrease in the mitotic index values compared with healthy volunteers and an increased percentage of aberrant metaphases. In the cytogenetic challenge assays, cisplatin-induced chromosomal damage in lymphocytes from patients was significantly higher than the frequency measured in healthy volunteers. The allele frequencies for *194Trp* or *399Gln* were not statistically different from patients and volunteers. There was no evidence that any of the alleles studied influenced the response to chromosomal aberrations or increased DNA sensitivity, except for an increased tendency in *Arg/Gln* individuals.

Referências bibliográficas

9. Referências bibliográficas

- ABDEL-RAHMAN, S. Z.; SOLIMAN, A. S.; BONDY, M. L.; OMAR, S.; EL-BADAWY, S. A.; KHALED, H. M.; SEIFELDIN, I. A.; LEVIN, B. Inheritance of the 194Trp and the 399Gln variant alleles of the DNA repair gene *XRCC1* are associated with increased risk of early-onset colorectal carcinoma in Egypt. **Cancer Letter**, v. 159, n. 1, p. 79-86, 2000.
- ABUL-HASSAN, K. S.; LEHNERT, B. E.; GUANT, L.; WALMSLEY, R. Abnormal DNA repair in selenium-treated human cells. **Mutation Research**, v. 565, n. 1, p. 45-51, 2004.
- ADORNO, E. V.; COUTO, F. D.; DE MOURA NETO, J. P.; MENEZES, J. F.; RÊGO, M.; DOS REIS, M. G.; GONÇALVES, M. S. Hemoglobinopathies in newborns from Salvador, Bahia, Northeast Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 21, n. 1, p. 292-298, 2005.
- AGRESTI, A. A survey of exact inference for contingency tables. **Statistical Science**, v. 7, p. 131-153, 1992.
- AHSAN, H.; RUNDLE, A.G. Measures of genotype versus gene products: promise and pitfalls in cancer prevention. **Carcinogenesis**, v. 24, p. 1429-1434, 2003.
- ALBERTINI, R. J.; ANDERSON, D.; DOUGLAS, G. R.; HAGMAR, L.; HEMMINK, K.; MERLO, F.; NATARAJAN, A. T.; NORPPA, H.; SHUKER, D. E. G.; TICE, R.; WATERS, M. D.; AITIO, A. IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. **Mutation Research**, v. 463, n. 2, p. 111-172, 2000.
- AMARA-MOKRANE, Y. A.; LEHUCHER-MICHEL, M. P.; BALANSARD, G.; DUMENIL, G.; BOTTA, A. Protective effects of alpha-hederin, chlorophyllin and ascorbic acid towards the induction of micronuclei by doxorubicin in cultured human lymphocytes. **Mutagenesis**, v. 11, n. 2, p. 161-167, 1996.
- AMER, J.; GHOTI, H.; RACHMILEWITZ, E.; KOREN, A.; LEVIN, C.; FIBACH, E. Red blood cells, platelets and polymorphonuclear neutrophils of patients with sickle cell disease exhibit oxidative stress that can be ameliorated by antioxidants. **British Journal of Haematology**, v. 132, n. 1, p. 108-113, 2006.
- ANGELINI, S.; KUMAR, R.; CARBONE, F.; MAFFEI, F.; FORTI, G. C.; VIOLANTE, F. S.; LODI, V.; CURTI, S.; HEMMINKI, K.; HRELIA, P. Micronuclei in humans induced by exposure to low level of ionizing radiation: influence of polymorphisms in DNA repair genes. **Mutation Research**, v. 570, n. 1, p. 105-117, 2005.
- ANTUNES L. M. G.; TAKAHASHI, C. S. Protection and induction of chromosomal damage by vitamin C in human lymphocyte cultures. **Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis**, v. 19, n. 1, p. 53-59, 1999.
- ANTUNES, L. M. G.; ARAÚJO, M. C. P.; DARIN, J. D. C.; BIANCHI, M. L. P. Effects of the antioxidants curcumin and vitamin C on cisplatin induced clastogenesis in Wistar rat bone marrow cells. **Mutation Research**, v. 465, n. 1-2, p. 131-137, 2000.

- ANTUNES, L. M. G.; PASCOAL, L. M.; BIANCHI, M. D. P. DIAS, F.L. Evaluation of the clastogenicity and anticlastogenicity of the carotenoid bixin in human lymphocyte cultures, **Mutation Research**, v. 585, n. 1-2, p. 113-119 2005.
- ANTUNES, L. M. G.; BUENO, R. D.; DIAS, F. D.; BIANCHI, M. D. Acetylsalicylic acid exhibits anticlastogenic effects on cultured human lymphocytes exposed to doxorubicin. **Mutation Research**, v. 626, p. 155-161, 2007.
- AU, W. W.; SALAMA, S. A.; SIERRA-TORRES, C. H. Functional characterization of polymorphisms in DNA repair genes using cytogenetic challenge assays. **Environmental and Health Perspectives**, v. 111, n. 15, p. 1843-1850, 2003.
- AU, W. W.; NAVASUMRIT, P.; RUCHIRAWAT, M. Use of biomarkers to characterize functions of polymorphic DNA repair genotypes. **International Journal Hygiene Environmental Health**, v. 207, n. 4, p. 301-313, 2004.
- AU, W. W. Heritable susceptibility factors for the development of cancer. **Journal of Radiation Research**, v. 47, Suppl. B13-B17, 2006.
- BACIUCHKA-PALMARO, M.; ORSIERE, T.; DUFFAUD, F.; SARI-MINODIER, I.; POMPILI, J.; BELLON, L.; DE MEO, M.; DIGUE, L.; FAVRE, R.; BOTTA, A. Acentromeric micronuclei are increased in peripheral blood lymphocytes of untreated cancer patients. **Mutation Research**, v. 520, n. 1-2, p. 189-191, 2002.
- BENDER, M. A.; PRESTON, R. J.; LEONARD, R. C.; PYATT, B. E.; GOOCH, P. C.; SHELBY, M. D. Chromosomal aberration and sister-chromatid exchange frequencies in peripheral blood lymphocytes of a large human population sample. **Mutation Research**, v. 204, n. 3, p. 421-433, 1988.
- BERGS, J. W. J.; FRANKEN, N. A. P.; TEN CATE, R.; VAN BREE, C.; HAVEMAN, J. Effects of cisplatin and γ -irradiation on cell survival, the induction of chromosomal aberration and apoptosis in SW-1573 cells. **Mutation Research**, v. 594, n. 1-2, p. 148-154, 2006.
- BOER, J.G de. Polymorphisms in DNA repair and environmental interactions. **Mutation Research**, v. 509, n. 1-2, p. 201-210, 2002.
- BONASSI, S.; HAGMAR, L.; STRÖMBERG, U.; HUICI, M. A.; TINNERBEREG, H.; KNUDSEN, L. E.; NORPPA, H. Chromosomal aberrations in lymphocytes predict human cancer independently of exposure to carcinogens. European Study Group on Cytogenetic Biomarkers and Health. **Cancer Research**, Genoa, v. 60, n. 6, p. 1619-1625, mar. 2000.
- BONASSI, S.; ZNAOR, A.; NORPPA, H.; HAGMAR, L. Chromosomal aberrations and risk of cancer in humans: an epidemiologic perspective. **Cytogenetic Genome Research**, v. 104, n. 1-4, p. 376-382, 2004.
- BONASSI, S.; UGOLINI, D.; KIRSCH-VOLDERS, M.; STRÖMBERG, U.; VERMEULEN, R.; TUCKER, J.D. Human population studies with cytogenetic

- biomarkers: Review of the literature and future perspectives. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 45, n. 2-3, p. 258-270, 2005.
- BOTTURA, C.; FERRARI, I. Études chromosomiques dans quelques anémies hémolytiques. **Acta Haematologica**, v. 28, p. 20-24, 1962.
- BREM, R.; HALL, J. XRCC1 is required for DNA single-strand break repair in human cells. **Nucleic Acids Research**, v. 33, n. 8, p. 2512-2520, 2005.
- BUCHANAN, G.; R.; DEBAUN, M.; R.; QUINN, C. T.; STEINBERG, M. H. Sick cell disease. **Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology**, p. 35-47 2004.
- CALDECOTT, K. W. XRCC1 and DNA strand break repair. **DNA Repair**, v. 2, n. 9, p. 955-969, 2003.
- CANALLE, R.; BURIM, R. V.; TONE, L. G.; TAKAHASHI, C. S. Genetic polymorphisms and susceptibility to childhood acute lymphoblastic leukemia. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 43, n. 2, p. 100-109, 2004.
- CANALLE, R.; ANDRADE, V. da S.; SCRIDELI, C. A.; QUEIROZ, R. G., TONE, L. G. Polymorphisms in the thymidylate synthase promoter and the DNA repair genes *XRCC1* and *XPB* in a Brazilian population. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 47, n. 9, p. 725-732, 2006.
- CANTERO, G.; PASTOR, N.; MATEOS, S.; CAMPANELLA, C.; CORTÉS, F.; Cisplatin-induced endoreduplication in CHO cell: DNA damage and inhibition of topoisomerase II. **Mutation Research**, v. 599, n. 1-2, p. 160-166, 2006.
- CHAAR, V.; KÉCLARD, L.; DIARA, J. P.; LETURDU, C.; ELION, J.; KRISHNAMOORTHY, R.; CLAYTON, J.; ROMANA, M. Association of *UGT1A1* polymorphism with prevalence and age at onset of cholelithiasis in sickle cell anemia. **Haematologica**, v. 90, n. 2, p. 188-199. 2005.
- CHAAR, V.; TARER, V.; ETIENNE-JULAN, M.; DIARA, J. P.; ELION, J.; ROMANA, M. ET-1 and eNOS gene polymorphisms and susceptibility to acute chest syndrome and painful vaso-occlusive crises in children with sickle cell anemia. **Haematologica**, v. 91 n. 9, p. 1277-1278, 2006.
- CHRISTMANN, M.; TOMICIC, M. T.; ROOS, W. P.; KAINA, B. Mechanisms of human DNA repair: an update. **Toxicology**, v. 193, n. 1-2, p. 3-34, 2003.
- CHUNG, H. H.; KIM, M-K.; KIM, J. W.; PARK, N-H.; SONG, Y-S.; KANG, S-B.; LEE, H-P. XRCC1 R399Q polymorphism is associated with response to platinum-based neoadjuvant chemotherapy in bulky cervical cancer. **Gynecologic Oncology**, v. 103, n. 3, p. 1031-1037, 2006.
- CORNETTA, T.; FESTA, F.; TESTA, A.; COZZI, R. DNA damage repair and genetic polymorphisms: assessment of individual sensitivity and repair capacity. **International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics**, v. 22, n. 2, p. 537-545, 2006.

- COSTA, R. N. P.; CONRAN, N.; ALBUQUERQUE, D. M.; SOARES, P. H.; SAAD, S. T. O.; COSTA, F. F. Association of the G-463A myeloperoxidase polymorphism with infection in sickle cell anemia. **Haematologica**, v. 90, n. 7, p. 977-979, 2005.
- COUTO, F. D.; ADORNO, E. V.; MENEZES, J. F.; MOURA NETO, J. P.; RÊGO, M. A. V.; REIS, M. G. dos; GONÇALVES, M. S. C677T polymorphism of the MTHFR gene and variant hemoglobins: a study in newborns from Salvador, Bahia, Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 20, n. 2, p. 529-533, 2004.
- CRUL, M.; SCHELLENS, J. H. M.; BEIJNEN, J. H.; MALIEPAARD, M. Cisplatin resistance and DNA repair. **Cancer Treatment Reviews**, v. 23, n. 5-6, p. 341-366, 1997.
- DE FRANCESCHI, L.; CORROCHER, R. Established and experimental treatments for sickle cell disease. **Haematologica**, v. 89, n. 3, p. 348-56, 2004.
- DE FREITAS, J. M.; MENEGHINI, R. Iron and its sensitive balance in the cell. **Mutation Research**, v. 475, n. 1-2, p. 153-159, 2001.
- DHALLA, N.S.; ELMOSELHI, A.B.; HATA, T.; MAKINO, N. Status of myocardial antioxidants in ischemia-reperfusion. **Cardiovascular Research**, v. 47, n. 3, p. 446-456, 2000.
- DI NUZZO, D. V. P.; FONSECA, S. F. Anemia falciforme e infecções. **Jornal de Pediatria**, v. 80, n. 5, p. 347-354, 2004.
- DIAS, F. L.; ANTUNES, L. M. G.; REZENDE, P. A.; CARVALHO, F. E. S.; SILVA, C. M. D.; MATHEUS, J. S.; VITOR JÚNIOR, O. J.; LOPES, G. P.; PEREIRA, G. A.; BALARIN, M. A. S. Cytogenetic analysis in lymphocytes from workers occupationally exposed to low levels of ionizing radiation. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, DOI:10.1016/j.etap.2006.10.003.
- DUARTE, M. C.; COLOMBO, J.; ROSSIT, A. R. B.; SILVA, A. E. Polymorphisms of the DNA repair genes *XRCC1* and *XRCC3* in a Brazilian population. **Genetics and Molecular Biology**, v. 28, n. 3, p. 397-401, 2005.
- DUELL, E. L.; MILLIKAN, R. C.; PITTMAN, G. S.; WINKEL, S.; LUNN, R. M.; TSE, C. K.; FATON, A.; MOHRENWEISER, H. W.; NEWMAN, B.; BELL, D. A. Polymorphisms in the DNA repair gene *XRCC1* and breast cancer. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 10, n. 3, p. 217-222, 2001.
- DUFLOTH, R. M.; COSTA, S.; SCHIMITT, F.; ZEFERINO, L. C. DNA repair gene polymorphisms and susceptibility to familial breast cancer in a group of patients from Campinas, Brazil. **Genetics and Molecular Research**, v. 4, n. 4, p. 771-782, 2005.
- DUYDU, Y.; USTUNDAG, A.; AYDIN, A.; EKEN, A.; DUNDAR, K.; UZUN, G. Increased sensitivity to mitomycin C-induced sister chromatid exchange in lymphocytes from patients undergoing hyperbaric oxygen therapy. **Environmental Molecular Mutagenesis**, v. 47, n. 3, p. 185-91, 2006.

FABRON, A. J.; Morbidade do traço falciforme. **Boletim da Sociedade Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 8, p. 93-95, 1986.

GOODE, E. L.; ULRICH, C. M.; POTTER, J. D. Polymorphisms in DNA repair genes and associations with cancer risk. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 11, n. 12, p. 1513-1530, 2002.

GOODE, E. L.; DUNNING, A. M.; KUSCHEL, B.; HEALEY, C. S.; DAY, N. E.; PONDER, B. A.; EASTON, D. F.; PHAROAH, P. P.; Effect of germ-line genetic variation on breast cancer survival in a population-based study. **Cancer Research**, v. 62, n. 11, p. 3052-3057, 2002.

GU, J.; BONDY, M. L.; SIGURDSON, A.; SPITZ, M. R.; HSU, T. C.; WU, X. Three measures of mutagen sensitivity in a cancer-free population. **Cancer Genetics and Cytogenetics**, v. 110, n. 1, p. 65-69, 1999.

HAGMAR, L.; BONASSI, S.; STROMBERG, U.; BROGGER, A.; SNUDSEN, L. E.; NORPPA, H.; REUTERWALL, C. Chromosome aberrations in lymphocytes predict human cancer: a report from the European Study Group on Cytogenetic Biomarkers and Health (ESCH). **Cancer Research**, v. 58, n. 18, p. 4117-4121, 1998.

HEBBEL, R.P.; EATON, J.W.; BALASINGAM, M.; STEINBERG, M.H. Spontaneous oxygen radical generation by sickle erythrocytes. **Journal Clinical Investigation**, v. 70, n. 6, p.1253-1259, 1982.

HENG, H. H.; STEVENS, J. B.; LIU, G.; BREMES, S. W.; YE, K. J.; REDDY, P. V. WU, G. S.; WANG, Y. A.; TAINSKY, M. A.; YE, C. J. Stochastic cancer progression driven by non-clonal chromosome aberrations. [Journal of Cellular Physiology](#), v. 208, n. 2, p. 461-72, 2006.

HERNÁNDEZ, A.; XAMENA, N.; GUTIÉRREZ, S.; VELÁZQUEZ, A.; CREUS, A.; SURRALLÉS, J.; GALOFRÉ, P.; MARCOS, R. Basal and induced micronucleus frequencies in human lymphocytes with different *GST* and *NAT2* genetic backgrounds. **Mutation Research**, v. 606, n. 1-2, p. 12-20, 2006.

HIRAN, S. Multiorgan dysfunction syndrome in sickle cell disease. **Journal of Association of Physicians of India**, v. 53, p. 19-22, 2005.

HSU, T. C.; JOHNSTON, D. A.; CHERRY, L. M.; RAMKISSOON, D.; SCHANTZ, S. P.; JESSUP, J. M.; WINN, R. J.; SHIRLEY, L.; FURLONG, C. Sensitivity to genotoxic effects of bleomycin in humans: possible relationship to environmental carcinogenesis. **International Journal of Cancer**, v. 43, n. 3, p. 403-309, 1989.

HSU, T. C., SPITZ, M. R., SCHANTZ, S. P. Mutagen sensitivity: a biological marker of cancer susceptibility. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 1, n. 1, p. 83-89, 1991.

HSU, T. C.; WU, X.; TRIZNA, Z. Mutagen sensitivity in humans. A comparison between two nomenclature systems for recording chromatid breaks. **Cancer Genetics and Cytogenetics**, v. 87, n. 2, p. 127-132, 1996.

- HUNG, R. J.; HALL, J.; BRENNAN, P.; BOFFETTA, P. Genetic polymorphisms in the base excision repair pathway and cancer risk: A HuGE review. **American Journal of Epidemiology**, v. n. 10, 162, p. 925-942, 2005.
- IARMARCOVAI, G.; SARI-MINODIER, I.; ORSIÈRE, T.; DE MÉO, M.; GALLICE, P.; BIDEAU, C.; INIESTA, D.; POMPILI, J.; BERGÉ-LEFRANE, J. L.; BOTTA, A. A combined analysis of *XRCC1*, *XRCC3*, *GSTM1* and *GSTT1* polymorphisms and centromere content of micronuclei in welders. **Mutagenesis**, v. 21, n. 2, p. 159-165, 2006.
- ISCN International System for Human Cytogenetic Nomenclature. Report of the Standing Committee on Human Cytogenetic Nomenclature. **Birth Defects Original Articles Series** v. 21, n. 1, p.1-117, 1985.
- JIN, L.; UNDERHILL, P. A.; BUONCRISTIANI, M.; ROBERTSON, J. M. Defining microsatellite alleles by genotyping global indigenous human populations and non-human primates. **Journal of Forensic Science**, v. 42, n. 3, p. 496-499, 1997.
- KARAHALIL, B.; SARDAS, S.; NESLIHAN, A. K.; ALHAYIROGLU, E.; KARAKAYA, A. E.; CIVELEK, E. Chromosomal aberration under basal conditions and after treatment with X-ray in human lymphocytes as related to the *GSTM1* genotype. **Mutation Research**, v. 515, n. 1-2, p. 135-140, 2002.
- KHAYAT, A. S.; GUIMARÃES, A. C.; CARDOSO, P. C.; LIMA, P. D. L.; BAHIA, M. O.; ANTUNES, L. M. G.; BURBANO, R. R. Mutagenicity of hydroxyurea in lymphocytes from patients with sickle cell disease. **Genetics and Molecular Biology**, v.27, n. 1, p. 115-117, 2004.
- KHAYAT, A. S.; ANTUNES, L. M.; GUIMARÃES, A. C.; BAHIA, M. O.; LEMOS, R. A. J.; CABRAL, I. R.; LIMA, P. D. L.; AMORIM, M. I. M.; CARDOSO, P. C. S.; SMITH, M. A. C.; SANTOS, R. A.; BURBANO, R. R.; Cytotoxic and genotoxic monitoring of sickle cell anaemia patients treated with hydroxyurea. **Clinical and Experimental Medicine**, v. 6, n. 1, p. 33-37, 2006.
- KIURU, A.; LINDHOLM, C.; HEILIMO, I.; CEPPI, M.; KOIVISTOINEN, A.; ILUS, T.; HIRVONEN, A.; NORPPA, H.; S. Influence of DNA repair gene polymorphisms on the yield of chromosomal aberrations. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 46, n. 3, p. 198-205, 2005.
- KLEINBAUM, D. G.; KUPPER, L. L.; MORGENSTERN, H. **Epidemiologic research: Principles and quantitative methods**. Belmont, CA: Wadsworth.
- KLINGS, E.S.; FARBER, H.W. Role of free radicals in the pathogenesis of acute chest syndrome in sickle cell disease. **Respiratory Research**, v. 2, n. 5, p.280-285, 2001.
- KRISHNASWAMY, G.; DEWEY, W. C. Cisplatin induced cell killing and aberrations in CHO cells: treated during G1 or S phase. **Mutation Research**, v. 293, n. 2, p. 161-172, 1993.

KUTLAR, A. Sickle cell disease: a multigenic perspective of a single gene disorder. **Hematology**, v. 10, Suppl. 1, p. 92-99, 2005.

LAN, Q.; ZHERG, T.; SHEN, M.; ZHANG, Y.; WANG, S. S.; ZAHM, S. H.; HOLFORD, T. R.; LEANDERER, B.; BOYL, P.; CHANOCK, S. Genetic polymorphisms in the oxidative stress pathway and susceptibility to non-Hodgkin lymphoma. **Human genetics**, PMID: 17149600, 2006.

LAS PENAS, R.; SANCHEZ-RONCO, M.; ALBEROLA, V.; TARON, M.; CAMPS, C.; GARCIA-CARBONERO, R.; MASSUTI, B.; QUERALT, C.; BOTIA, M.; GARCIA-GOMEZ, R.; ISLA, D.; COBO, M.; SANTARPIA, M.; CECERE, F.; MENDEZ, P.; SANCHEZ, J. J.; ROSELL, R.; SPANISH LUNG CANCER GROUP. Polymorphisms in DNA repair genes modulate survival in cisplatin/gemcitabine-treated non-small-cell lung cancer patients. **Annals of Oncology**, v. 17, n. 4, p. 668-675, 2006.

LAZUTKA, J. R.; MIERAUSKIENE, J.; SLAPSYTE, G.; DEDONYTE, V. Genotoxicity of dill (*Anethum graveolens* L.), peppermint (*Mentha piperita* L.) and pine (*Pinus sylvestris* L.) essential oils in human lymphocytes and *Drosophila melanogaster*. **Food and chemical toxicology**, v. 39, n. 5, p. 485-492, 2001.

LIU, S. H.; CHEN, Y. H.; LOH, C. H.; YANG, T.; WU, T. N.; CHEN, C. J.; HSIEH, L. L. The association between frequencies of mitomycin C-induced sister chromatid exchange and cancer risk in arseniasis. **Toxicology Letters**, v. 128, n. 3, p. 237-243, 2002.

LUNN, M. R.; LANGLOIS, R. G. ; HSIEH, L. L. ; THOMPSON, C. L. ; BELL, D. A. *XRCC1* polymorphisms : effects on aflatoxin B1-DNA adducts and glycophorin A variant frequency. **Cancer Research**, v. 59, n. 11, p. 2557-2561, 1999.

MADIGAN, C.; MALIK, P. Pathophysiology and therapy for haemoglobinopathies. Part I: sickle cell disease. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, v. 8, n. 9, p. 1-23, 2006.

MATEUCA, R.; AKA, P.V.; DE BOECK, M.; HAUSPIE, R.; KIRSH-VOLDERS, M.; LISON, D. Influence of *hOOG1*, *XRCC1* and *XRCC3* genotypes on biomarkers of genotoxicity in workers exposed to cobalt or hard metal dusts. **Toxicology Letters**, v. 156, n. 2, p. 277-288, 2005.

M'BEMBA-MEKA, P.; LEMIEUX, N.; CHAKRABARTI, S. K. Role of oxidative stress and intracellular calcium in nickel carbonate hydroxide-induced sister-chromatid exchange, and alterations in replication index and mitotic index in cultured human peripheral blood lymphocytes. **Archives of toxicology**, PMID: 16826409, 2006.

METHA, S. R.; AFENYI-ANNAN, A.; BYRNS, P. J.; LOTTENBERG, R. Opportunities to improve outcomes in sickle cell disease. **American Family Physician**, v. 74, n. 2, p. 303-310, 2006.

MIGLIORI, L.; PETROZZI, L.; LUCETTI, C.; GAMBACCINI, G.; BERNARDINI, S.; SCARPATO, R.; TRIPPI, F.; BARALE, R.; FRENZILLI, G.; RODILLA, V.; BONUCCELLI, U. Oxidative damage and cytogenetic analysis in leukocytes of Parkinson's disease patients. **Neurology**, v. 58, n. 12, p. 1809-1815, 2002.

MOHRENWEISER, H. W.; JONES, L. M. Variation in DNA repair is a factor in cancer susceptibility: a paradigm for the promises and perils of individual and population risk estimation? **Mutation Research**, v. 400, n. 1-2, p. 15-24, 1998.

MOHRENWEISER, H. W.; WILSON, D. M.; JONES, L. M. Challenges and complexities in estimating both the functional impact and the disease risk associated with the extensive genetic variation in human DNA repair genes. **Mutation Research**, 526, n. 1-2, p. 93-125, 2003.

MOORHEAD, P. S.; NOWELL, P. C.; MELLMAN, W. J.; BATTIPS, D. M.; HUNGERFORD, D. A. Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. **Experimental Cell Research**, v. 20, p. 613-616, 1960.

NADIN, B. S.; VARGAS-ROIG, L. M.; DRAGO, G.; IBARRA, J.; CIOCCA, D. R. DNA damage and repair in peripheral blood lymphocytes from healthy individuals and cancer patients: a pilot study on the implications in the clinical response to chemotherapy. **Cancer Letters**, v. 239, n. 1, p. 84-97, 2006.

NEFIC, H. Anticlastogenic effect of vitamin C on cisplatin induced chromosome aberrations in human lymphocyte cultures. **Mutation Research**, v. 498, n. 1-2, p. 89-98, 2001.

NORPPA, H.; BONASSI, S.; HANSTEEN, I.-L.; HAGMAR, L.; STRÖBERG, U.; RÖSSNER, P.; BOFFTTA, P.; LINDHOLM, C.; GUNDY, S.; LAZUTKA, J.; CEBULSKA-WASILEWSKA, A.; FABIÁNOVÁ, E.; SRAM, R. J.; KNUDSEN, L. E.; BARALE, R.; FUCIC, A. Chromosomal aberrations and SCEs as biomarkers of cancer risk. **Mutation Research**, v. 600, n. 1-2, p. 37-45, 2006.

OBE, G.; PFEIFFER, P.; SAVAGE, J. R. K.; JOHANNES, C.; GOEDECKE, W.; JEPPESEN, P. NATARAJAN, A. T.; MARTÍNEZ-LOPEZ, W.; FOLLE, G. A.; DRETS, M. E. Chromosomal aberrations: formation, identification and distribution. **Mutation Research**, v. 504, n. 1-2, p. 17-36, 2002.

OFFER, T.; BHAGAT, A.; LAL, A.; ATAMNA, W.; SINGER, S. T.; VICHINSKY, E. P.; KUYPERS, F. A.; AMES, B. N. Measuring chromosome breaks in patients with thalassemia. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1054, p. 439-444, 2005.

OHE, T.; TSUDA, S.; SAKATA, Y.; TANIWAKI, M.; MISAWA, S.; ABE, T. Cis-diamminedichloroplatinum(II)-induced sister-chromatid exchanges and chromosome aberration formation in cultured human lymphocytes and their inhibition by sodium thiosulfate. **Mutation Research**, v. 244, n. 4, p. 279-285, 1990.

PERNICE, F.; FLOCCARI, F.; CACCAMO, C.; BELGHITY, N.; MANTUANO, S.; PACILÈ, M. E.; ROMEO, A.; NOSTRO, L.; BARILLÀ, A.; CRASCI, E.; FRISINA, N.; BUEMI, M. Chromosomal damage and atherosclerosis. A protective effect from simvastatin. **European Journal of Pharmacology**, v. 332, n. 3, p. 223-229, 2006.

- QU, T.; MORIMOTO, K.; X-ray repair-cromplementing group 1 polymorphisms and cancer risks in Asian populations: A mini review. **Cancer Detection and Prevention**, v. 29, n. 3, p. 215-220, 2005.
- QUINTELA-FANDINO, M.; HITT, R.; MEDINA, P. P.; GAMARRA, S.; MANSO, L.; CORTES-FUNES, H.; SANCHEZ-CEPESDES, M. DNA-Repair gene polymorphisms predict favorable clinical outcome among patients with advanced squamous cell carcinoma of the head and neck treated with cisplatin-based induction chemotherapy. **Journal of Clinical Oncology**, v. 24, n. 26, p. 4333-4339, 2006.
- RONCADA, T.; VICENTINI, V. E.; MANTOVANI, M. S. Possible modulating actions of plant extracts on the chromosome breaking activity of MMC and Ara-C in human lymphocytes in vitro. **Toxicology in vitro**, v. 18, n. 5, p. 617-622, 2004.
- ROSSIT, A. R. B.; CABRAL, I. R.; HACKEL, C.; SILVA, R. de C. M. A. da; FROES, N. D. T. C.; ABDEL-RAHMAN, S. Z. Polymorphisms in the DNA repair gene *XRCC1* and susceptibility to alcoholic liver cirrhosis in older Southeastern Brazilians. **Cancer Letter**, v. 180, n. 2, p. 173-182, 2002.
- RUF, A. A.; JEWOOD, D.; WEBB, J.; ANDERSON, D. Sensitivity of different thalassaemia genotypes to food mutagens in the Comet assay. **Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis**, Suppl. 2, p. 83-91, 2003.
- RZESZOWSKA-WOLNY, J.; POLANSKA, J.; PIETROWSKA, M.; PALYVODA, O.; JAWORSKA, J.; BUTKIEWICZ, D.; HANCOCK, R. Influence of polymorphisms in DNA repair genes *XPD*, *XRCC1* and *MGMT* on DNA damage induced by gamma radiation and its repair in lymphocytes in vitro. **Radiation research**, v. 164, n. 2, p. 132-140, 2005.
- SARDAS, S.; YILMAZ, M.; OZTOK, U.; CAKIR, N.; KARAKAYA, A.E. Assessment of DNA strand breakage by comet assay in diabetic patients and the role of antioxidant supplementation. **Mutation Research**, v. 490, n. 2, p. 123-129, 2001.
- SAVAGE, J. R. K. A note on inter-arm intrachange patterns resulting from dual-arm fish painting. **Mutation Research**, v. 373, n. 2, p. 265-269, 1997.
- SHEN, M. R.; JONES, I. M.; MOHRENWEISER, H. Nonconservative amino acid substitution variants exist at polymorphic frequency in DNA repair genes in healthy humans. **Cancer Research**, v. 58, n. 4, p. 604-608, 1998.
- SHENG, K.; SHARIFF, M.; HEBBEL, R. P. Comparative oxidation of hemoglobins A and S. **Blood**, v. 91, n. 9, p. 3467-3470, 1998.
- SILVA FILHO, I. L.; GONÇALVES, M. S.; ADÔRNO, E. V.; CAMPOS, D. P.; FLEURY, M. K. Triagem de hemoglobinopatias e avaliação da degeneração oxidativa da hemoglobina em trabalhadores portadores do traço falciforme (HbAS), expostos a riscos ocupacionais. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 27, n. 3, p. 183-187, 2005.

- SKJELBRED, C. F.; SVENDSEN, M.; HAUGAN, V.; EEK, A. K.; CLAUSEN, K. O.; SVENDSEN, M. V.; HNSTEEN, I-L. Influence of DNA repair gene polymorphisms of *hOGG1*, *XRCC1*, *XRCC3*, *ERCC2* and the folate metabolism gene *MTHFR* on chromosomal aberration frequencies. **Mutation Research**, v. 602, n. 1-2, p. 151-162, 2006.
- SPITZ, M. R.; FUEGER, J. J.; BEDDINGFIELD, N. A.; ANNEGERS, J. F.; HSU, T. C.; NEWELL, G. R.; SCHANTZ, S. P. Chromosome sensitivity to bleomycin-induced mutagenesis, an independent risk factor for upper aerodigestive tract cancers. **Cancer Research**, v. 49, n. 16, p. 4626-4628, 1989.
- STEINBERG, M. H. Predicting clinical severity in sickle cell anaemia. **British Journal of Haematology**, v. 129, n. 4, p. 465-481, 2005.
- STURGIS, E. M.; CASTILHO, E. J.; LI, L.; ZHENG, R.; FICHER, S. A.; CLAYMAN, G. L.; STROM, S. S.; SPITZ, M. R.; WEI, O. Polymorphisms of DNA repair gene *XRCC1* in squamous cell carcinoma of the head and neck. **Carcinogenesis**, v. 20, n. 11, p. 2125-2129, 1999.
- TRIPPI, F.; BOTTO, N.; SCARPATO, R.; PETROZZI, L.; BONUCCELLI, U.; LATORRACA, S.; SORBI, S.; MIGLIORE, L. Spontaneous and induced chromosome damage in somatic cells of sporadic and familial Alzheimer's disease patients. **Mutagenesis**, v.16, n. 4, p. 323-327, 2001.
- TUIMALA, J.; SZEKELY, G.; GUNDY, S.; HIRVONEN, A.; NORPPA, H. Genetic polymorphisms of DNA repair and xenobiotic-metabolizing enzymes: role in mutagen sensitivity. **Carcinogenesis**, v. 23, n. 6, p. 1003-1008, 2002.
- VAN GILS, C. H.; BOSTICK, R. M.; STEM, M. C.; TAYLOR, J. A. Differences in base excision repair capacity may modulate the effect of dietary antioxidant intake on prostate cancer risk: an example of polymorphisms in the *XRCC1* gene. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 11, n. 11, p. 1279-1284, 2002.
- VARGAS, A. E.; DA SILVA, M. A. L.; SILLA, L.; CHIES, J. A. B. Polymorphisms of chemokine receptors and eNOS in Brazilian patients with sickle cell disease. **Tissue Antigens**, v. 66, n. 6, p. 683-690, 2005.
- VODICKA, P.; KUMAR, R.; STETINA, R.; SANYAL, S.; SOUCEK, P.; HAUFROID, V.; DUSINSKA, M.; KURICOVA, M.; ZAMECNIKOVA, M.; MUSAK, L.; BUCHANCOVA, J.; NORPPA, H.; HIRVONEN, A.; VODICKOVA, L.; NACCARATI, A.; MATOUSU, Z.; HEMMINKI, K. Genetic polymorphisms in DNA repair genes and possible links with DNA repair rates, chromosomal aberrations and single-strand breaks in DNA. **Carcinogenesis**, v. 25, n. 5, p. 757-763, 2004.
- WEATHERALL, M. W.; HISGGS, D. R.; WEISS, H.; WEATHERALL, D. J.; SERJEANT, G. R. Phenotype/genotype relationships in sickle cell disease: a pilot twin study. **Clinical and Laboratory Haematology**, v. 27, n. 6, p. 384-390, 2005.
- WEAVER, D. A.; CRAWFORD, E. L.; WARNER, K. A.; ELKHAIRI, F.; KHUDER, S. A.; WILLEY, J. C. *ABCC5*, *ERCC2*, *XPA* and *XRCC1* transcript abundance levels

correlate with cisplatin chemoresistance in non-small cell lung cancer cell lines. **Molecular Cancer**, v. 4, n. 1, p. 18, 2005.

WILDING, C. S.; RELTON, C. .; REES, G. S.; TARONE, R. E.; WHITEHOUSE, C. A.; TAWN, E. J. DNA repair gene polymorphisms in relation to chromosome aberration frequencies in retired radiation workers. **Mutation Research**, v. 570, n. 1, p. 137-145, 2005.

WYATT, N.; KELLY, C.; FONTANA, V.; MERLO, D. F.; WHITELAW, D.; ANDERSON, D. The responses of lymphocytes from Asian and Caucasian diabetic patients and non-diabetics to hydrogen peroxide and sodium nitrite in the Comet assay. **Mutation Research**, v. 609, n. 2, p. 154-164, 2006.

ZAGO, M. A. Considerações gerais. In: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, organizador. Manual de diagnóstico e tratamento das doenças falciformes. Brasília: Ministério da Saúde.; p. 9-11, 2001.

ZIJNO, A.; VERDINA, A.; GALTÍ, R.; LEOPARDI, P.; MARCON, F.; ANDREOLI, C.; ROSSI, S.; CREBELLI, R. Influence of DNA repair polymorphisms on biomarkers of genotoxic damage in peripheral lymphocytes of healthy subjects. **Mutation Research**, v. 600, n. 1-2, p. 184-192, 2006.

Anexos

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TÍTULO DO PROJETO: “Análise cromossômica dos linfócitos do sangue periférico de indivíduos com anemia falciforme”

Responsáveis pelo Projeto: Profa. Dra. Lusânia Maria Gregg Antunes (Orientadora)
Prof. Dr. Paulo Roberto Juliano Martins (Co-orientador)
Profa. Dra. Francisca da Luz Dias (Colaboradora)
Polyanna Miranda Alves

Nome do Participante: _____ Idade: _____

RG-HE: _____ RG-GEN: _____

Documento de Identificação: _____

ESCLARECIMENTO:

A anemia falciforme é uma doença que afeta a molécula de hemoglobina das células “vermelhas” do sangue, que são chamadas cientificamente de hemácias. As hemácias dos indivíduos que têm anemia falciforme apresentam várias alterações bioquímicas. Estas alterações estão relacionadas com a presença de substâncias produzidas a partir do oxigênio, que vão aumentar o quadro de estresse celular, o que pode causar a morte de outros tipos celulares, tais como os linfócitos (células brancas) do sangue periférico. O objetivo deste projeto é investigar se existem alterações nos cromossomos, ou seja, nas estruturas onde se encontra o nosso material genético (DNA), entre os indivíduos com anemia falciforme e os indivíduos saudáveis, que não apresentam esta doença.

Este projeto será desenvolvido por professores-pesquisadores da disciplina de Genética do Departamento de Ciências Biológicas e do Serviço de Hematologia e Hemoterapia do Hospital Escola da Faculdade de Medicina do Triângulo Mineiro. Os indivíduos que concordarem em participar da pesquisa, após a assinatura do termo de consentimento, permitirão a realização de uma punção venosa (coleta de amostra de sangue), onde serão coletados 5ml de sangue com material descartável, para a realização do projeto. A coleta do sangue será feita por profissionais habilitados desta Faculdade, obedecendo todos os critérios para evitar os riscos de contaminação e hemorragia, além disso, o material colhido será usado exclusivamente para a execução desta pesquisa. Os dados serão confidenciais, sendo os indivíduos colaboradores identificados por código do laboratório e os dados obtidos não relacionados com a identidade dos doadores. As informações sobre a história clínica de cada participante serão obtidas nos arquivos do Hemocentro da FMTM. Informamos ainda que a participação na pesquisa não será remunerada.

CONSENTIMENTO:

Eu, _____, li e compreendi o que está escrito neste documento e também fui esclarecido por meio de palavras. Concordo com a pesquisa, doando amostra do meu sangue de acordo com a descrição neste documento. Estou ciente de que posso cancelar esta autorização a qualquer momento, sem que isto me cause penalização ou prejuízo em meu benefício.

Por ser verdade, firmo esta autorização.

Uberaba, _____ de _____ de 2005

Assinatura do participante

Pessoa que obteve o consentimento

Nome legível e assinatura

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TÍTULO DO PROJETO: “ANÁLISE DO POLIMORFISMO DO GENE DE REPARO DO DNA *XRCC1* EM INDIVÍDUOS COM ANEMIA FALCIFORME”

Responsáveis pelo Projeto: Profa. Dra. Lusânia Maria Gregg Antunes (Orientadora)
Prof. Dr. Paulo Roberto Juliano Martins (Co-orientador)
Polyanna Miranda Alves (Pós-graduanda)

Nome do Participante: _____ Idade: _____

RG-HE: _____ RG-GEN: _____

Documento de Identificação: _____

ESCLARECIMENTO:

Gostaríamos de convidá-lo a participar de uma pesquisa, cujo título é “Análise do polimorfismo do gene de reparo do DNA *XRCC1* em indivíduos com anemia falciforme”. O objetivo deste estudo é verificar a frequência do gene *XRCC1* em indivíduos com anemia falciforme e comparar com os indivíduos não falcêmicos. Este projeto será desenvolvido por professores-pesquisadores da disciplina de Genética do Departamento de Ciências Biológicas e do Serviço de Hematologia e Hemoterapia do Hospital Escola da Faculdade de Medicina do Triângulo Mineiro. O presente estudo contribuirá para a identificação dos polimorfismos genéticos em indivíduos com anemia falciforme e poderá fornecer dados para a implementação de terapias futuras para a anemia falciforme.

Caso você concorde em participar, esclarecemos que não será realizado nenhum procedimento que traga risco para a sua saúde. Os indivíduos que participarem da pesquisa, após a assinatura do termo de consentimento, permitirão a realização de uma punção venosa (coleta de amostra de sangue), onde serão coletados 10 ml de sangue com material descartável, para a realização do projeto. A coleta do sangue será feita por profissionais habilitados desta Universidade, obedecendo todos os critérios para evitar os riscos de contaminação e hemorragia, além disso, o material colhido será usado exclusivamente para a execução desta pesquisa. Os dados serão confidenciais, sendo os indivíduos colaboradores identificados por código do laboratório e os dados obtidos não relacionados com a identidade dos doadores. Esclarecemos ainda, que se colaborar com esta pesquisa, você terá direito a todas as informações relacionadas ao projeto. É importante saber que você não é obrigado a participar deste estudo e que pode retirar o seu consentimento no momento que desejar, sem que o seu atendimento seja prejudicado. Você não receberá qualquer valor em dinheiro pela sua participação, mas também estará livre de qualquer responsabilidade sobre as despesas deste projeto.

CONSENTIMENTO:

Eu, _____, li e compreendi o que está escrito neste documento e também fui esclarecido por meio de palavras. Concordo com a pesquisa, doando amostra do meu sangue de acordo com a descrição neste documento. Estou ciente de que posso cancelar esta autorização a qualquer momento, sem que isto me cause penalização ou prejuízo em meu benefício.

Por ser verdade, firmo esta autorização.

Uberaba, _____ de _____ de _____

Assinatura do participante

Pessoa que obteve o consentimento

Nome legível e assinatura

Telefone de contato dos pesquisadores (34) 3318-5434

Em caso de qualquer dúvida em relação a esse documento, você poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, pelo telefone (34) 3318-5458.